

UNIVERZITA KARLOVA

Přírodovědecká fakulta

Studijní program: Biochemie

Studijní obor: Biochemie



Bc. Paulína Takácsová

**STUDIUM ÚČINKU PROTINÁDOROVÝCH LÉČIV INHIBITORŮ
TYROSINKINAS VE FORMĚ NANOTRANSPORTÉRŮ**

Study of action of anticancer drugs tyrosine kinase inhibitors in a form of nanotransporters

Diplomová práce

Vedoucí práce: prof. RNDr. Marie Stiborová, DrSc.

Praha, 2019

Prohlášení:

Prohlašuji, že jsem tuto závěrečnou práci vypracovala samostatně pod vedením prof. RNDr. Marie Stiborové, DrSc. a že jsem uvedla všechny použité informační zdroje a literaturu. Tato práce ani její podstatná část nebyla předložena k získání jiného nebo stejného akademického titulu.

V Praze dne

Podpis:

Poděkování:

Touto cestou bych chtěla především poděkovat své školitelce prof. RNDr. Marii Stiborové DrSc. za cenné rady, usměrnění a trpělivost při tvoření práce. Také bych chtěla poděkovat Mgr. Radku Indrovi PhD. za veškerou pomoc při experimentech v laboratoři a objasňování experimentálních přístupů. Mé velké poděkování patří RNDr. Ivanu Barvíkovi PhD. z Matematicko - fyzikální fakulty UK za velkou pomoc, trpělivost a rady při počítačovém modelování enkapsulace protinádorových léčiv do dutiny apoferritinu. V neposlední řadě bych chtěla poděkovat doc. RNDr. Václavu Martínkovi z katedry biochemie za provedení molekulárního dockingu vandetanibu.

Práce byla podporována grantovou agenturou České republiky (18 – 10251S)

Abstrakt

Inhibitory tyrosinkinas (TKI) jsou malé organické molekuly, které se používají jako léčiva při cílené protinádorové terapii. V nádorových buňkách inhibují vybrané aktivované receptorové tyrosinkinasy a brání tak proliferaci, růstu a metastázám nádoru, a angiogenesi v nádorové tkáni. Lenvatinib a vandetanib jsou inhibitory tyrosinkinas, které se používají pro léčbu karcinomu štítné žlázy. Předkládaná diplomová práce rozšiřuje poznání cest využitelných ke zvýšení účinnosti daných protinádorových léčiv.

Jedno ze studovaných protinádorových léčiv - lenvatinib - jsme se pokusili připravit ve formě nanočástic. Jako transportní částice jsme využili protein apoferritin a liposomy.

Počítačové modelování interakce lenvatinibu se strukturou apoferritinu a model jeho enkapsulace signalizovalo, že toto léčivo není vhodné pro přípravu apoferritinových nanočástic. A to vzhledem k tomu, že se při jejich přípravě vyskytuje převážně v neutrální formě. Tento předpoklad potvrdily i experimenty, ve kterých se částice lenvatinibu v apoferritinu skutečně nepodařilo připravit. Použitý počítačový model nám tak může do budoucna posloužit pro „screening“ konstrukce protinádorových léčiv ve formě nanočástic ještě před samotnou experimentální přípravou.

Jelikož byla příprava apoferritinových částic lenvatinibu neúspěšná, pokusili jsme se připravit toto léčivo ve formě liposomových nanotransportérů. Výtěžek byl však natolik nízký, že takto tvořené částice lenvatinibu v liposomech nemají v protinádorové léčbě prakticky využití.

Druhým studovaným léčivem byl vandetanib. Metabolismus tohoto protinádorového léčiva ovlivňuje jeho účinnost při léčbě. Doposud bylo zjištěno, že vandetanib je oxidován lidskými cytochromy P450 na *N*-desmethylvandetanib, a to zejména CYP1A1, 2D6 a 3A4. Nejefektivnější při oxidaci vandetanibu je CYP3A4, přičemž přítomnost cytochromu *b*₅ výrazně zvyšuje efektivitu reakce. V diplomové práci jsme se snažili objasnit důvod této efektivní oxidace studiem enzymové kinetiky oxidace vandetanibu danými enzymy.

Studium enzymové kinetiky oxidace vandetanibu lidskými CYP1A1 a 2D6 ukázalo, že do jejich aktivního centra se váže jedna molekula substrátu. Naopak sigmoidální enzymová kinetika oxidace vandetanibu CYP3A4 ukazuje, že do aktivního centra tohoto enzymu se mohou vázat až dvě molekuly substrátu. Tyto výsledky byly v souladu s modelem získaným molekulárním „dockingem“ molekuly vandetanibu do

aktivního centra CYP3A4. Vazba dvou molekul vandetanibu do aktivního centra CYP3A4 vysvětluje jeho efektivnější oxidaci, než je tomu v případě CYP1A1 a 2D6.

Klíčová slova: inhibitory tyrosinkinas, nanočástice, lenvatinib, vandetanib, cytochrom P450

Abstract

Tyrosine kinase inhibitors (TKI) are small organic molecules designed for the targeted cancer therapy. They perform the inhibition of activated receptor tyrosine kinases in tumor cells, that defeats tumor growth, proliferation, metastasis and angiogenesis in tumor tissue. Two TKI, lenvatinib and vandetanib, are used in thyroid cancer treatment. This thesis investigates the ways leading to enhancement of efficiency of these anticancer drugs for therapy.

One of the studied anticancer drug – lenvatinib – was investigated to be prepared in a nanoform. Nanoparticles were based on protein apoferritin as well as on lipids.

Theoretical model of lenvatinib interaction with an apoferritin cavity, as well as the model of its encapsulation obtained by computer modeling indicated that lenvatinib seems not to be suitable for preparation of apoferritin nanoparticles. Since lenvatinib occurs in its neutral form during preparation of nanoparticles, it does not interact with nanoparticle. The unsuccessful experimental preparation of lenvatinib-loaded apoferritin nanoparticles confirmed that lenvatinib is not suitable for its preparation. However, the theoretical model can serve for screening of other potentially suitable drugs before the experimental nanoparticle preparation.

Since the experimental preparation of apoferritin nanoparticles was not successful, we used liposomes as lenvatinib nanocarriers in further experiments. The amount of prepared nanoparticles is however low, therefore not relevant for cancer therapy.

The second anticancer drug, which we focused on, was vandetanib. It was found that the metabolism of vandetanib influences the efficiency to vandetanib during therapy. Vandetanib is oxidized into *N*-desmethylvandetanib, by the reaction that is catalyzed by human CYP1A1, 2D6 and 3A4. The most effective oxidation is carried out by CYP3A4. Moreover, the presence of cytochrome *b*₅ significantly increases the yield of reaction. In order to explain this effective oxidation, we investigated the enzyme kinetics of vandetanib oxidation by mentioned CYPs.

The study of enzyme kinetics of vandetanib oxidation by human CYP1A1 and 2D6 showed that only one molecule of vandetanib binds into their active sites. On the contrary, sigmoidal enzyme kinetics of vandetanib oxidation by CYP3A4 showed that two molecules of vandetanib can be bound into the active site. Experimental results of enzyme kinetics were in accordance with the results found by molecular “docking”. As a result, binding of two molecules of substrate vandetanib into the active site of CYP3A4 allows

more effective oxidation of vandetanib by this enzyme in contrast to the oxidation catalyzed by CYP1A1 and 2D6.

Key words: tyrosine kinase inhibitors, nanoparticles, lenvatinib, vandetanib, cytochrome P450

Obsah

1. Teoretický úvod	11
1.1 Charakterizace nádorových onemocnění	11
1.2 Molekulární mechanismy vzniku rakoviny	13
1.2.1 Proto – onkogeny	14
1.2.1.1 Tyrosinkinasové receptory	15
1.2.2 Tumorové supresory	16
1.2.3 MicroRNA	17
1.3 Léčba nádorových onemocnění	17
1.3.1 Chirurgické odstranění nádoru	17
1.3.2 Radioterapie	18
1.3.3 Chemoterapie	18
1.3.3.1 Ellipticin	19
1.3.4 Cílená léčba rakoviny	19
1.3.4.1 Inhibitory tyrosinkinas	19
1.3.4.1.1 Lenvatinib	21
1.3.4.1.2 Vandetanib	21
1.4 Metabolismus protinádorových léčiv	23
1.4.1 Odbourávání léčiv v organismu	23
1.4.2 Cytochromy P450	23
1.4.3 Flavinové monooxygenasy (FMO)	25
1.4.4 Metabolismus vandetanibu	26
1.5 Nanočástice a jejich využití při léčbě nádorových onemocnění	26
1.5.1 Lipidové nanočástice	28
1.5.2 Nanočástice na bázi proteinů	29
1.5.2.1 Nanočástice na bázi apoferritinu	29
1.6 Klasická molekulární dynamika	30
1.6.1 Pohybové rovnice	30
1.6.2 Silové pole – Force field	31
1.6.3 Výpočet nevazebných interakcí	33
1.6.4 Numerická integrace pohybových rovnic	33
1.6.5 Software a hardware použitý pro molekulárně – dynamické simulace	34
2. Cíl diplomové práce	35

3. Materiál a metody	36
3.1 Přístroje a materiál	36
3.2 Chemikálie	37
3.3 Metody	38
3.3.1 Počítačové modelování enkapsulace léčiv do dutiny apoferritinu	38
3.3.2 Příprava nanočástic lenvatinibu v apoferritinu	41
3.3.2.1 Výběr rozpouštědla pro přípravu nanočástic lenvatinibu v apoferritinu	41
3.3.2.2 Příprava nanočástic lenvatinibu v apoferritinu s použitím roztoku lenvatinibu rozpuštěného v ethylenglykolu, ethanolu a <i>N,N</i> -dimethylacetamidu	43
3.3.3 Příprava nanočástic lenvatinibu v liposomech	46
3.3.3.1 Příprava částic lenvatinibu v liposomech za použití roztoku lenvatinibu rozpuštěného v DMSO	46
3.3.4 Kinetika oxidace vandetanibu katalyzovaná lidskými rekombinantními cytochromy P450	47
3.3.5 Molekulární „docking“ vandetanibu do Sloučeniny I lidských CYP1A1, 2D6 a 3A4	49
4. Výsledky	50
4.1 Počítačové modelování enkapsulace léčiv do apoferritinu	50
4.1.1 Distribuce ellipticinu uvnitř dutiny apoferritinu	51
4.1.2 Distribuce lenvatinibu uvnitř dutiny apoferritinu	53
4.1.3 Enkapsulace molekul ellipticinu do dutiny apoferritinu	55
4.1.4 Enkapsulace molekul lenvatinibu do dutiny apoferritinu	57
4.2 Příprava částic lenvatinibu v apoferritinu	59
4.2.1 Výběr rozpouštědla pro přípravu částic lenvatinibu v apoferritinu	59
4.2.2 Příprava částic lenvatinibu v apoferritinu za použití roztoku lenvatinibu rozpuštěného v ethylenglykolu, <i>N,N</i> -dimethylacetamidu a ethanolu	59
4.3 Příprava částic lenvatinibu v liposomech	62
4.3.1 Příprava částic lenvatinibu v liposomech za použití roztoku lenvatinibu rozpuštěného v DMSO	63
4.4 Kinetika oxidace vandetanibu katalyzovaná lidskými rekombinantními cytochromy P450	64

5. Diskuse	68
6. Závěr	71
Seznam použité literatury	72

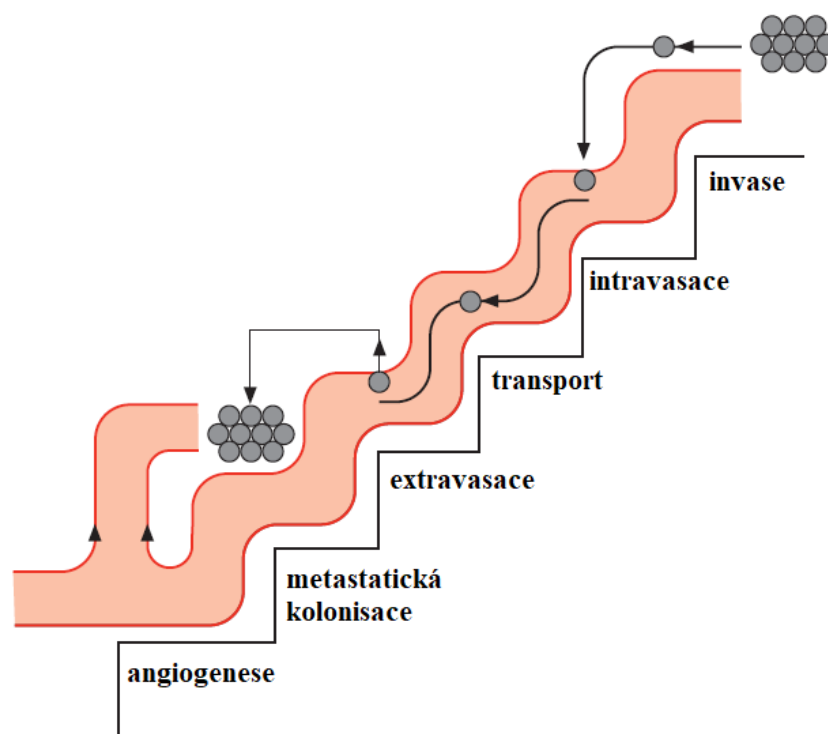
1. TEORETICKÝ ÚVOD

1.1 CHARAKTERIZACE NÁDOROVÝCH ONEMOCNĚNÍ

V roce 2018 přibylo celosvětově 18,1 milionů případů rakoviny a 9,6 milionů případů úmrtí na rakovinu. Nejčastěji diagnostikovaná je rakovina plic. Dále jsou nejčastěji diagnostikované rakovina prsu u žen a rakovina prostaty u mužů. Nejčastější příčinou úmrtí na rakovinu je rakovina plic, dále kolorektální rakovina, rakovina žaludku a rakovina jater (Bray a kol., 2018).

Nádorové buňky mají dvě základní vlastnosti, které je činí nebezpečnými po zdravé buňky: nádorové buňky a jejich potomstvo postrádají omezení v buněčném dělení a šíří se a kolonisují oblasti, které jsou vyhrazené pro jiné zdravé buňky. Hmota abnormálních buněk, které nekontrolovatelně proliferují se nazývá tumor nebo neoplasie (Alberts a kol., 2014). Nádory mohou vznikat z jakéhokoli typu tkáně. U lidí jsou nejběžnější nádory vzniklé z epitelálních buněk neboli karcinomy. Ostatní typy nádorů jsou hematopoetické nádory z buněk oběhového a imunitního systému, neuroektodermální nádory vzniklé z buněk nervového systému a sarkomy, které mají původ v mesenchymálních buňkách (Weinberg, 2007 a). Rozlišujeme nádory benigní, které jsou dobře diferencované, vykazují pomalý růst, případně stagnují nebo ustupují, nešíří se do okolních tkání a nemetastázuji. Naopak maligní nádory jsou málo diferencované, nepodobají se původní tkáni, rychle rostou, šíří se do okolních tkání a metastázuji do jiných částí těla (Porth, 2014).

Metastázy jsou příčinou velké většiny úmrtí spojených s nádorovým onemocněním. Tento komplexní proces však zůstává nejméně pochopeným aspektem biologie rakoviny (Weinberg a kol., 2016). Proces metastázy se dá rozdělit do pěti hlavních kroků: invase, intravasace, transport, extravasace a metastatická kolonisace. V procesu invase se nádorová buňka separuje od okolních buněk a extracelulární matrix. Při intravasaci dochází ke vstupu nádorové buňky do krevní nebo lymfatické cévy, následuje transport ve směru toku krve. Poté v procesu extravasace nádor opouští cévu a dochází k metastatické kolonisaci, kdy se nádor usídí v dané tkáni. Angiogeneze, tedy novotvorba cév zabezpečuje přísun kyslíku a živin nádorovým buňkám. Schéma procesu tvorby metastáz je zobrazená na Obr. 1 (Pecorino, 2012).

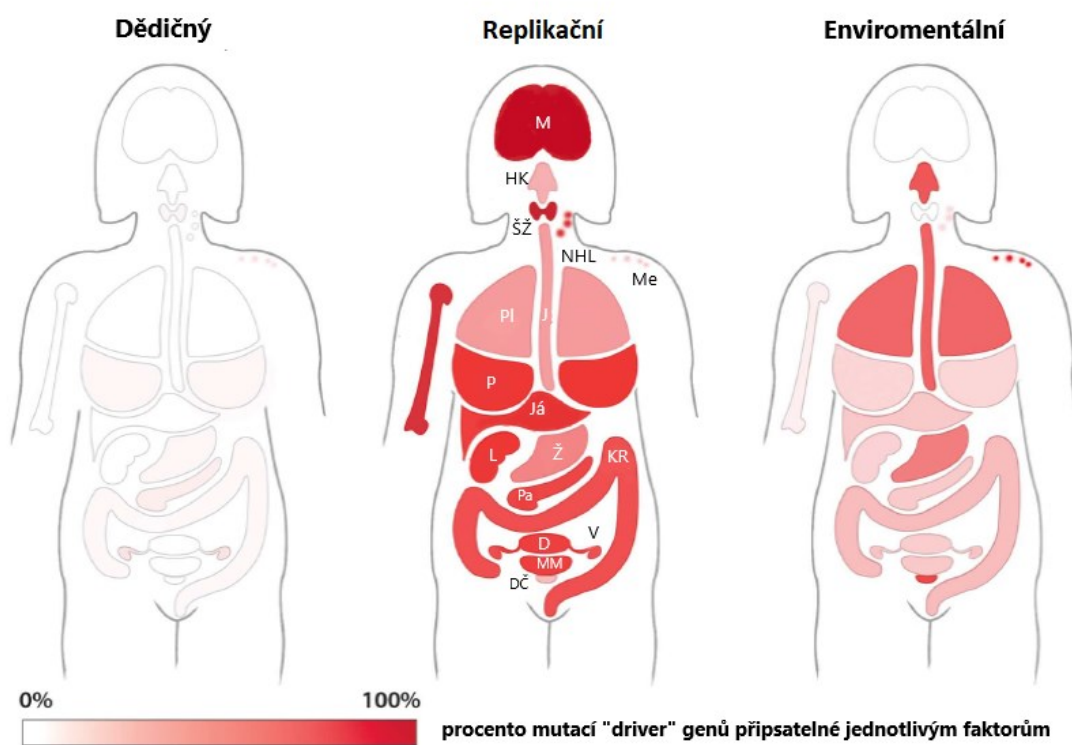


Obrázek 1: Hlavní kroky v procesu tvorby metastáz. **Invaze:** dochází k oddělení buněk primárního nádoru od okolních buněk a extracelulární matrix. **Intravasace:** dochází ke vstupu do krevní nebo lymfatické cévy. **Transport:** Nádorová buňka nebo shluk buněk je transportovaný cévou po směru toku krve. **Extravasace:** Opuštění cévy za účelem metastatické kolonisace tkáně. **Metastatická kolonisace:** usídlení nádoru v dané tkáni, přičemž dochází ke angiogenezi, tj. cévní novotvorbě, aby si nádorové buňky zabezpečily přísun kyslíku a živin. Převzato a upraveno dle (Pecorino, 2012).

Mikroprostředí nádoru aktivně ovlivňuje další vývoj rakoviny. Je to dynamické prostředí, ve kterém interagují nádorové buňky s nebuněčnými strukturami extracelulární matrix a buňkami hostitelské tkáně jako tumor - asociované fibroblasty a imunitní buňky a jejich sekretované produkty jako jsou cytokiny a chemokiny (Maman a Witz, 2018). Jednotlivé faktory mikroprostředí mají na vývoj nádoru různý vliv. Mnoho z nich jako například makrofágy, fibroblasty, regulační T_{reg} - lymfocyty, tak i mnohé cytokiny a chemokiny urychlují vývoj nádoru. Naopak inhibiční efekt mají granulocyty, imunocyty a jejich produkty či jiné buňky a molekuly, o jejichž funkci víme relativně málo (Klein-Goldberg a kol, 2014). Také vývoj metastázy nádoru je daný mnohonásobnou interakcí mezi metastatickými buňkami a homeostatickými mechanizmy mikroprostředí, které napomáhají růstu nádorových buněk, jejich šíření, metastázování a angiogenezi. Přerušení interakce mezi hostitelským mikroprostředím a metastatickými buňkami může snížit nebo eliminovat metastázy nádorů (Talmadge a Fidler, 2010).

1.2 MOLEKULÁRNÍ MECHANISMY VZNIKU RAKOVINY

Rakovina je způsobena změnou v tzv. „driver“ genech, kterými jsou geny kódující tumorové supresory, proto-onkogeny a geny kódující microRNA. Změna v jednom z těchto genů obvykle nestačí pro vznik nádorové buňky, ve většině případů jde o několikakrokový proces sekvenčních změn (Croce, 2008). Na to, aby se vzniklé mutace šířily do dceřiných buněk, musí vzniknout v dělicích se buňkách. Jestli vzniknou v diferencovaných buňkách, jako jsou svalové či mozkové buňky, jen málokdy vyvolají rakovinu (Lodish a kol., 2013). Tyto mutace mohou vzniknout vlivem environmentálního faktoru jako je například cigaretový kouř, dědičného faktoru nebo replikačního faktoru, který zahrnuje mutace způsobené chybami při normální replikaci DNA. Na Obr. 2 je znázorněno, které orgány jsou nejvíc postiženy jednotlivými typy faktorů u žen trpících rakovinou (Tomasetti a kol. 2017).



Obrázek 2: Příspěvky jednotlivých faktorů na mutacích u jednotlivých typů rakoviny u žen. Na obrázku je ukázaných 18 zástupců typů rakoviny. Pro každý zástupný typ rakoviny je v procentech vyjádřen příspěvek dědičného, environmentálního a replikačního faktoru způsobeného chybami při replikaci DNA. Součet příspěvků všech tří faktorů dává 100%. M = mozek; HK = hlava a krk; ŠŽ = štítná žláza; NHL = non Hodgkin lymfom; Me = melanom; J = jáce; Pl = plíce; P = prs; Já = játra; L = ledvina; Ž = žaludek; Pa =

pankreas; KR = kolorektum; D = děloha; MM = močový měchýř; V = vaječník; DČ = děložní čípek. Převzato a upraveno dle (Tomasetti C. a kol., 2017).

Spontánní poškození DNA, které může vést k mutaci je způsobeno nepřesností funkce DNA polymerasy při normální replikaci DNA nebo nepřímým chemickým poškozením DNA a následným přenesením chyb do replikované DNA. Indukované poškození je vyvolané chemickými karcinogeny nebo fyzikálními karcinogeny (Bertram, 2001). V případě chemického poškození jde obvykle o elektrofilní karcinogeny, které atakují nukleofilní struktury DNA (Miller a Miller, 1975). V případě fyzikálního poškození se jedná o poškození v důsledku ionisujícího nebo ultrafialového záření (Bertram, 2001). Ionisující záření může poškodit molekulu DNA buď přímo anebo nepřímo, kdy molekulu DNA poškozují reaktivní formy jiných molekul, které vznikly vlivem ionisujícího záření, a to především volné radikály produkované z vody (Ward, 1988) Ultrafialové záření je pohlcované molekulou DNA a dává vznik thymidylovým dimerům (Beukers, 1959). Poškození DNA a karcinogeneze vyvolaná vlivem ultrafialového záření se manifestuje u pacientů s onemocněním *Xenoderma pigmentosum*. Při tomto onemocnění dochází k defektům při opravě poškozené DNA ultrafialovým zářením. Jestli se včas nediagnostikuje, dochází k extrémně vysoké incidenci rakoviny kůže (Lehmann a kol., 1975).

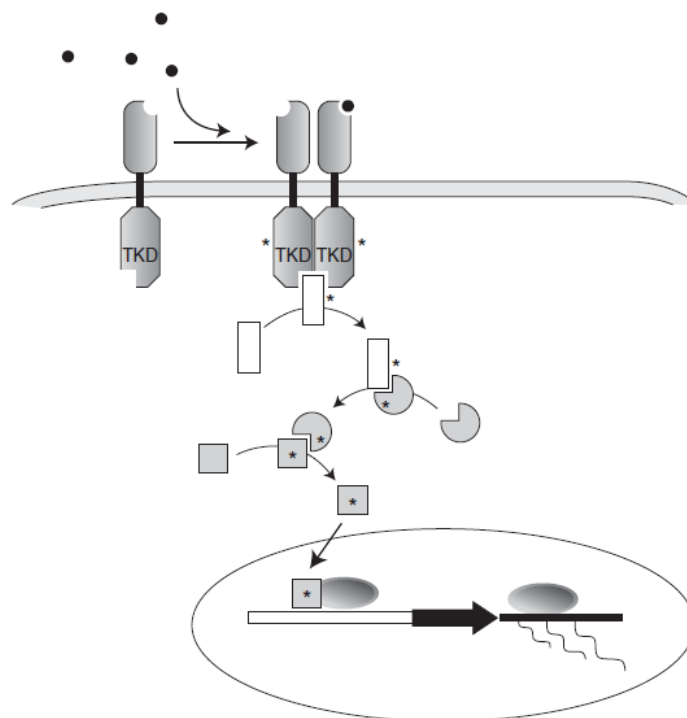
1.2.1 Proto-onkogeny

Proto-onkogeny jsou geny kódující proteiny, které stimulují nebo zvyšují dělení a viabilitu buněk a inhibují také buněčnou smrt. Normální verze těchto genů se nazývá proto-onkogen, mutovaná či jinak poškozená verze se nazývá onkogen (Mol a Balan, 2013). Mezi proto-onkogeny řadíme růstové faktory, receptory růstových faktorů, komponenty buněčné signalisace, transkripční faktory a geny zapojené v kontrole nad buněčným cyklem (Crocker a Murray, 2003) K aktivaci proto-onkogenu dochází dvěma mechanismy, v důsledku strukturních změn proteinu nebo v důsledku změny v regulaci genu. Ke změnám v regulaci proto-onkogenu dochází v důsledku provirové integrace proto-onkogenu, genové amplifikace a chromosomální translokace (Weinberg, 2007 b). První evidence vzniku rakoviny v důsledku genové nestability byla zaznamenána ve spojitosti s Burkittovým lymfomem, kdy dochází k translokaci onkogenu *MYC* na chromosom 14, nesoucí „enhacervé“ elementy pro expresi těžkého řetězce imunoglobulinů. V důsledku

toho se onkogen *MYC* aktivuje (Dalla-Favera, 1982). Teorie „oncogene addiction“ (v překl. závislost na onkogenu) vyjadřuje, že udržování nádorové buňky často závisí na kontinuální aktivitě určitých onkogenů (Weinstein, 2002). Tento jev se dá demonstrovat na příkladu myši s inducibilním onkogenem *MYC*, který způsoboval kožní papilomy, lymfomy a osteosarkomy. Po vyřazení tohoto genu došlo k regresi nádorů (Felsher, a Bishop, 1999). Kromě aktivace onkogenů a ztráty tumorových supresorů hrají při vývoji nádorového onemocnění roli další geny, které jsou esenciální pro nádorové buňky, avšak ne pro normální buňky, tzv. „non - oncogene addiction“ (NOA; v překl. „nezávislý na onkogenech“). Dělíme je na vnitřní nádorové geny „NOA“ podporující nádorové buňky autonomně a vnější geny „NOA“, které se nachází v stromálních a cévních buňkách a poskytují heterotypickou podporu nádoru (Luo a kol., 2009).

1.2.1.1 Tyrosinkinasové receptory

Struktura tyrosinkinasových receptorů sestává z extracelulární, transmembránové a intracelulární domény. Extracelulární doména tyrosinkinasových receptorů, která váže ligand, je složena z oddělené globulární domény. Intracelulární doména je složena z „juxtamembránové“ oblasti (oblast vedle transmembránového helixu), tyrosinkinasové katalytické oblasti a C-terminální oblasti (Hubbard a Till, 2000). Obecně se aktivace receptorových tyrosinkinas „spouští“ navázáním ligandu, kterým je růstový faktor. Buďto bivalentní ligand spojuje receptorové molekuly, které mohou a nemusí být v přímém kontaktu nebo dochází k dimerizaci bez přímé účasti ligandu, kdy jsou spojeny receptorové molekuly a ligand nevstupuje do rozhraní (Lemmon a Schlessinger, 2010). Receptor s aktivní kinasovou doménou následně transfosforyluje specifické zbytky tyrosinu intracelulární domény druhé molekuly v důsledku aktivace smyčky v molekule, která uvolní místo pro molekulu ATP. Transfosforylace stabilizuje „otevřenou“ konformaci a ničí vazbu mezi tyrosylovými zbytky a vazebným místem pro proteinové substráty nitrobuněčné signalisace, které je tak volné pro vazbu substrátu (Ségalliny a kol, 2012). Zjednodušené schéma aktivace tyrosinkinasových receptorů je znázorněno na Obr. 3 (Song a kol., 2013). V důsledku onkogenické transformace dochází ke zvýšení aktivity nebo ke konstitutivní aktivitě kinasy, a to je doprovázeno kvalitativními nebo kvantitativními změnami v buněčné signalisaci (Blume-Jensen a Hunter, 2001).



Obrázek 3: Buněčná signalisace zprostředkovaná receptorovými tyrosinkinasami. Aktivace receptoru na povrchu buňky nejdříve vede k dimerizaci a následně transfosforylaci intracelulární domény. Aktivovaný receptor „spustí“ buněčnou signalisaci, v mnohých případech také zprostředkovanou kinasami. Signalisace obvykle vede ke změnám na úrovni genové exprese. TKD = tyrosinkinasová doména. Převzato z (Song a kol., 2013).

1.2.2 Tumorové supresory

Tumorové supresory zabezpečují opravy DNA, předcházení nekontrolovatelnému růstu buněk a aktivaci „check-points“ (míst kontroly) buněčného cyklu (Lee a Muller, 2010). Jedinci s oběma poškozenými alelami pro tumorový supresorový gen mají mnohem vyšší riziko vzniku nádorového onemocnění. U jedinců s jednou funkční alelou se nemusí vyvinout nádorové onemocnění, avšak jsou k němu náchylní vzhledem k tomu, že jim zůstává jenom jedna funkční alela (Berg a kol., 2006). Nejznámějším tumorovým supresorem je protein p53 a jeho signální dráha, který je mutovaný, anebo funkčně inaktivovaný prostřednictvím klíčových proteinů signální dráhy ve většině nádorových onemocnění (Juntilla a Evan, 2009).

1.2.3 MicroRNA

MicroRNA (MiRNA) jsou jednovláknové nekódující molekuly RNA, které brání expresi proteinů vazbou na jejich příslušnou mRNA a následnou degradací nebo inhibicí v translaci (Murphy a MacFarlane, 2010). Mohou kontrolovat buněčnou proliferaci, diferenciaci, přežití, metabolismus, genomovou stabilitu, zánět, invasi a angiogenesi při vzniku nádoru (Lin a Gregory, 2015). Pri-miRNA je syntetisována v jádře RNA polymerázou II a následně je enzymově štěpena pomocí endonukleasy „Drosha“, přičemž vzniká pre-miRNA. Ta je pomocí Exportinu-5 transportována z jádra do cytoplasmy a zde dochází k dalšímu štěpení pomocí ribonukleasy „Dicer“ na maturovanou miRNA (Reddy, 2015). Geny kódující miRNA mohou být poškozeny podobně jako geny kódující proteiny: přeuspořádáním chromosomů, genovou amplifikací či mutacemi a delecemi. Také může dojít k poškození proteinů, které jsou zodpovědné za biosyntézu miRNA, jako například „Drosha“ či „Dicer“ (Di Leva a kol., 2013).

1.3 LÉČBA NÁDOROVÝCH ONEMOCNĚNÍ

1.3.1 Chirurgické odstranění nádoru

Chirurgické odstranění nádoru představuje pro mnohé pacienty primární léčbu nádoru a také jim dává nejlepší šanci na vyléčení (Elder a Barber, 2018). Chirurgie je nejdůležitější při odstranění primárního nádoru, vzhledem k tomu, že i jedno použití vyléčí mnohem více pacientů než jakákoli jiná léčba rakoviny a zároveň odstraní téměř sto procent nádorových buněk (Urruticoechea a kol., 2010). To, jestli je nádor vhodný k odstranění pomocí resekce, závisí na jeho velikosti, lokaci a propojení s okolními strukturami. Úspěšná resekce celého nádoru představuje jeho vyjmutí beze zbytku nemocné tkáně, bez ohledu na funkci operovaného orgánu (Elder a Barber, 2018). Chirurgický zákrok může zastávat funkci při diagnóze a určení stádia nemoci, funkci léčebné resekce, prevence rakoviny, rekonstrukce po léčbě rakoviny nebo kontroly symptomů choroby (Rees a Sweetland, 2015). Pro diagnostiku rakoviny se většinou využívá tzv. „jehlová“ biopsie (tkáň se odebere jehlou), která dokáže spolehlivě diagnostikovat invazivní malignity. Pro diagnózu a určení stádia břišních nádorů se využívá laparoskopie (Reed, 2009).

1.3.2 Radioterapie

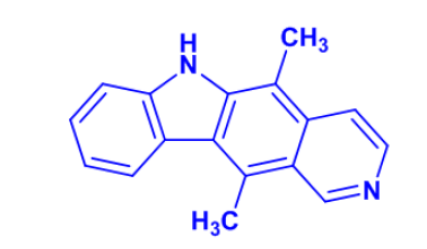
Radioterapie je důležitá metoda, která se využívá při léčbě nádorových onemocnění či už samostatně, nebo v kombinaci s chemoterapií nebo chirurgickým ošetřením (Yaromina a kol., 2012). Oproti systematické léčbě léčebná radioterapie eliminuje mikroskopické a makroskopické nádory ionisujícím zářením lokálně nebo lokoregionálně (Kerr a kol., 2016). Technické pokroky v radioterapii umožňují přizpůsobit dávky záření tak, aby byly šetřeny zdravé tkáně (Higgins a kol., 2015). Techniky IMRT (z angl. intensity – modulated radioteraphy) a IGRT (z angl. image – guided radioteraphy) dokážou přizpůsobit dávku a intenzitu záření na základě 3D-modelu, který zobrazuje jak tumory, tak celkovou anatomii pacienta (Jaffray, 2012). Princip chemoterapie, tak i radioterapie spočívá v tom, že při léčbě dochází k poškození DNA. Zdravé buňky před dalším dělením, tedy vstupem do mitotické fáze, vykonají opravy DNA, na rozdíl od nádorových buněk, které poškození ignorují a vstupují do tzv. „mitotické katastrofy“, přičemž se poškozená DNA rozdělí do dceřiných buněk. V úspěšné terapii dochází k „nastartování“ zbývajících apoptických procesů a eliminaci těchto buněk (Weinberg, 2007 c).

1.3.3 Chemoterapie

Nádorové buňky ztratily citlivost vůči inhibitorům buněčného růstu, proto unikají buněčné smrti. Chemoterapeutika vyvolávají apoptosu nádorových buněk, buďto přímou interferencí s DNA, nebo cílením na proteiny, které jsou klíčové pro signalisaci buněčného růstu (Dickens a Ahmed, 2018). Na základě jejich biochemických vlastností je můžeme rozdělit do několika skupin: alkylační činidla důležitých proteinů, DNA a RNA; anti-metabolity syntézy DNA nebo RNA; protinádorová chemoterapeutika, která po interkalaci do DNA vytvářejí zlomy; inhibitory topoisomeras; léčiva vázající tubulin, která vedou k inhibici tvorby mikrotubulů (Femando a Jones, 2015). Léková resistance je největším problémem při systémové chemoterapii. Může k ní dojít primárně, kdy tumor na léčbu vůbec neodpovídá nebo sekundárně, kdy po počáteční odpovědi na léčbu dochází k resistenci (Kumar a kol., 2017).

1.3.3.1 Ellipticin

Planární polycyklická struktura ellipticinu (Obr. 4) se interkaluje do DNA s vysokou afinitou. Ellipticin se v lidském těle vyskytuje jak v nabitě, tak v nenabitě formě. Lipofilní nenabitá molekula ellipticinu snadno prostupuje membránou buněk a kladný náboj léčiva pak stabilisuje jeho interakci s DNA (Ibrahim-Ouali a Dumur, 2018). Kromě interkalace do DNA funguje ellipticin také jako „jed“ topoisomerasy II, přičemž dochází ke zvýšení množství kovalentních komplexů topoisomeras a štěpené DNA v buňce (Vann a kol., 2016). Ellipticin je v těle enzymově aktivován, přičemž jeho oxidací pomocí cytochromů P450 vznikají sloučeniny, které vytváří kovalentní adukty s DNA (Stiborová a kol., 2004).



Obrázek 4: Struktura ellipticinu. Převzato z (Ibrahim-Ouali a Dumur, 2018).

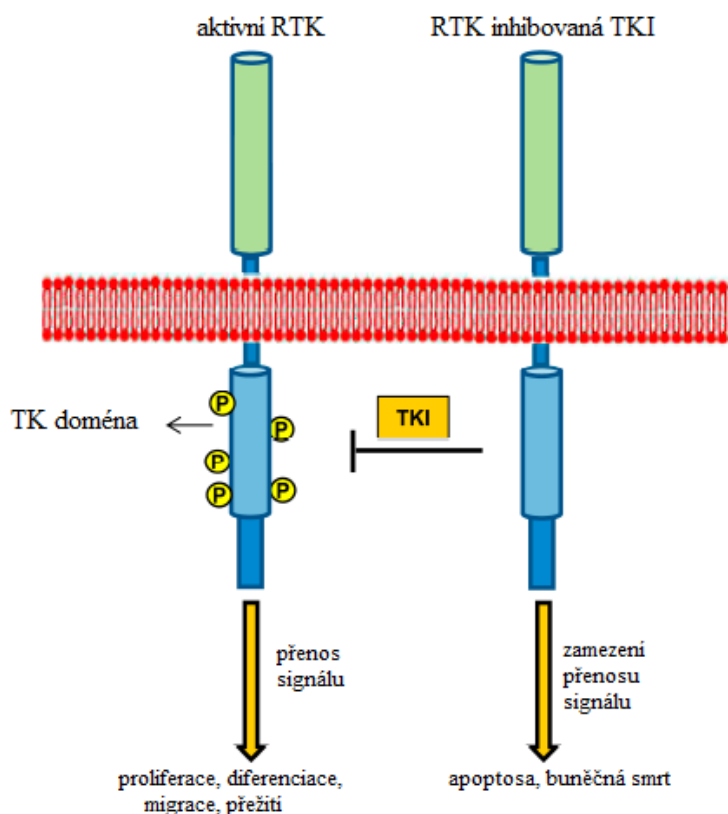
1.3.4 Cílená léčba rakoviny

Koncept cílené léčby zabezpečuje inhibici, respektive zpomalení růstu nádorových buněk pomocí chemických sloučenin, přičemž zdravé buňky zůstanou nezasáhnuty (Papasotiriou, 2014). Při cílené léčbě rakoviny se využívají dvě skupiny látek. Jednou z nich jsou malé molekuly inhibitorů, které se zaměřují na inhibici kinas a prevenci aktivace signálních drah, které ztratily v nádorových buňkách regulaci. Druhou skupinou jsou monoklonální protilátky, které přerušují interakci mezi ligandem a receptorem, blokováním aktivního centra proteinu, nebo odstraněním daného proteinu pomocí žírných buněk (mastocytů) nebo endocytosou (Baudino, 2015).

1.3.4.1 Inhibitory tyrosinkinas

Inhibitory tyrosinkinas (TKI) jsou malé organické molekuly volně prostupující přes cytoplasmatickou membránu, které interagují s cytoplasmatickou doménou tyrosinkinasových receptorů a inhibují tak jejich katalytickou aktivitu (Obr. 5) (Farsangi-

Hojjat, 2014). Mechanismem účinku je kompetice vazby ATP do aktivního centra tyrosinkinasového receptoru. Část struktury inhibitoru, která se váže do aktivního centra a kompetuje s ATP je více méně podobná adeninovému kruhu. Selektivita jednotlivých TKI je pak zabezpečena částí struktury, která není podobná ATP (Gotink a Verheul, 2010). Existuje také třída TKI, která inhibuje tyrosinkinasové receptory allostericky, přičemž tyto inhibitory mají oproti kompetujícím inhibitorům výhodu větší specifity, protože jsou cíleny na unikátní domény (Levitzki, 2012). Schéma inhibice tyrosinkinasových receptorů zprostředkována TKI je znázorněna na Obr. 5 (Farsangi-Hojjat, 2014). Jelikož se inhibitory tyrosinkinas podávají chronicky, může docházet k interakci léčivo-léčivo. Může tak jednak dojít k farmakodynamickým interakcím, kdy při podání další účinné látky dochází ke změně farmakologického účinku a jednak k farmakokinetickým interakcím, kdy dochází ke snížení množství a doby účinku léčiva. Farmakokinetický efekt je způsoben zejména změnami v absorpci léčiva a jeho metabolismem katalyzovaným cytochromy P450 (CYP) (van Leeuwen, 2014).



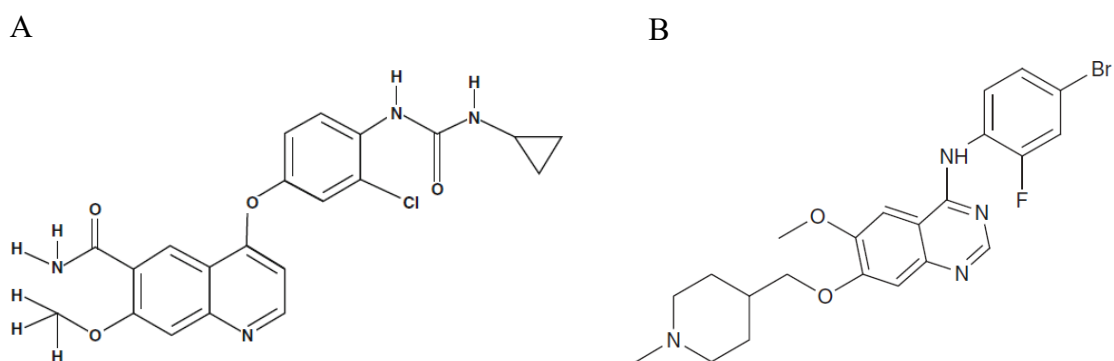
Obrázek 5: Cílená inhibice receptorů tyrosinkinas (RTK) prostřednictvím inhibitorů tyrosinkinas (TKI). Blokování kinasové domény pomocí malých organických molekul TKI inhibuje fosforylaci TK domény a zamezí buněčné proliferaci, diferenciaci, migraci a indukuje apoptosu. Fosfátové skupiny jsou zobrazeny jako žluté kroužky. Převzato a upraveno dle (Farsangi-Hojjat, 2014).

1.3.4.1.1 Lenvatinib

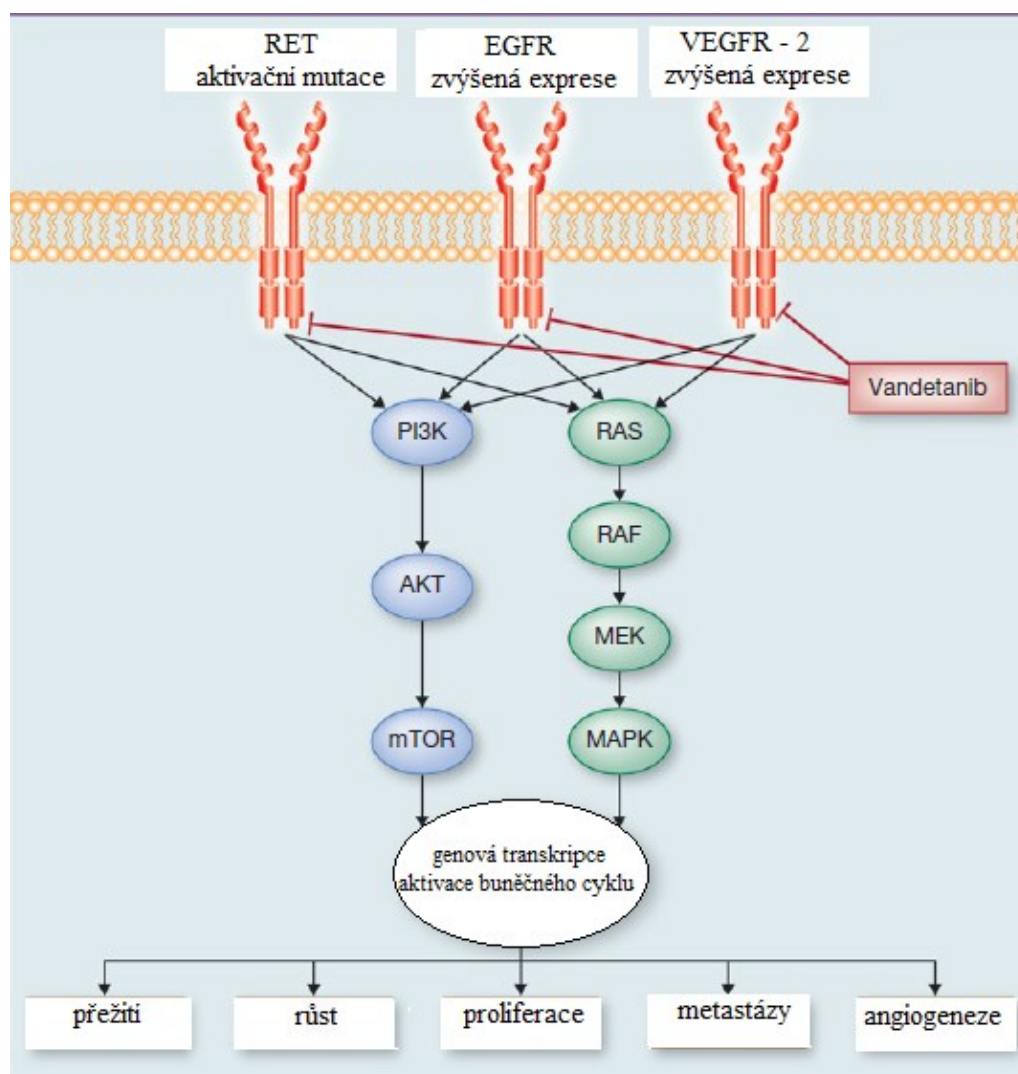
V únoru roku 2015 byl lenvatinib (obr. 6A) (Lenvima; Eisai) schválen US Food and Drug Administration (FDA) pro léčbu pacientů s metastatickým, progresivním diferencovaným nádorem štítné žlázy, který neopovídá na léčbu radioterapií jodem-131 (online na [fda.gov | drugs | informationdrugs. https://www.fda.gov/drugs/informationondrugs/ucm437515.htm](https://www.fda.gov/drugs/informationondrugs/ucm437515.htm)). Působí jako inhibitor receptorové kinasy VEGFR (vascular endothelial growth factor receptor) 1-3 a FGFR (fibroblast growth factor receptor) 1-4 (Yamamoto a kol., 2014), PDGFR (platelet derived growth factor receptor) a KIT receptorové tyrosinkinasy (Matsui a kol., 2008), které sehrávají nezbytnou roli při angiogenezi a nádorovém šíření. Kromě toho vykazuje také protinádorovou aktivitu inhibicí RET (rearrange during transfection) receptorovou tyrosinkinasu (Tohyama a kol., 2014). Mezi rizika spojená s užíváním tohoto léčiva patří hypertenze, srdeční selhání, arteriální trombotické příhody, hepatotoxicita, proteinurie a jiné.

1.3.4.1.2 Vandetanib

Vandetanib (Obr. 6B) byl v dubnu v roce 2011 schválen FDA pro léčbu pacientů s lokálně pokročilým, nebo metastatickým medulárním nádorem štítné žlázy, které nelze operovat (Chau a Haddad, 2013), a to na základě jeho účinnosti ve třetí testovací fázi (Wells Jr. a kol., 2012). Působí jako inhibitor několika tyrosinkinasy receptorů, konkrétně RET (rearrange during transfection) receptor (Carlomagno a kol., 2002), VEGFR-2 (vascular endothelial growth factor receptor) a EGFR (epithelial growth factor receptor (Wedge a kol., 2002) (Obr. 7). Mezi vedlejší účinky patří srdeční arytmie (prodloužení QT intervalu, ventrikulární tachykardie), která může způsobit náhlou smrt. Kromě toho může způsobit těžké podráždění kůže, intersticiální plicní onemocnění, hypertenzi, sníženou funkci štítné žlázy, trávicí potíže, ischemické cerebrovaskulární příhody, srdeční selhání, snížení funkce ledvin a jater (příbalový letáček léčiva Caprelsa® (vandetanib), 2014).



Obrázek 6: A:Chemická struktura lenvatinibu. Převzato z (Scott, 2015). B: Chemická struktura vandetanibu. Převzato z (Commander a kol., 2011).



Obrázek 7: Cílení vandetanibu jakožto TKI na aktivované tyrosinkinasové receptory při medulárním karcinomu štítné žlázy. Převzato a upraveno dle (Chau a Haddad, 2013).

1.4 METABOLISMUS PROTINÁDOROVÝCH LÉČIV

1.4.1 Odbourávání léčiv v organismu

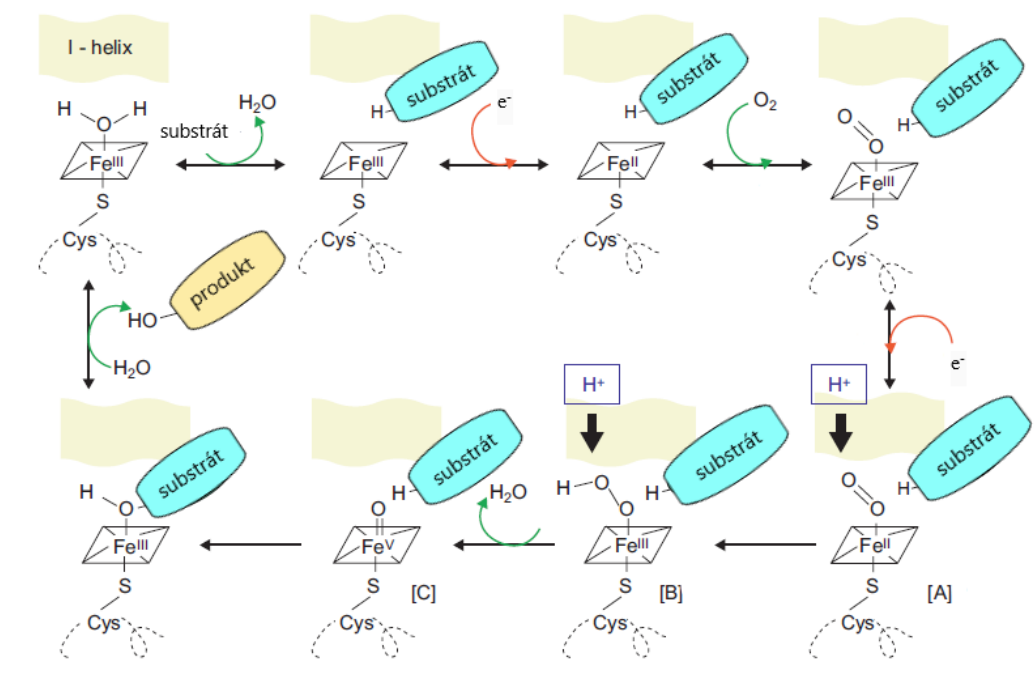
Xenobiotika, jako jsou léčiva či toxikanty, jsou obvykle lipofilní látky, které se dostávají do organismu pasivní difuzí přes membrány, a tudíž nemohou být z těla snadno exkretovány (Timbrell a Marrs, 2009). Metabolismus xenobiotika a jeho detoxikace probíhá v třech fázích. Ve fázi I a II dochází k proměně léčiva na hydrofilnější deriváty (Hoffmann a kol., 2014). Ve fázi I dochází k vytvoření nebo demaskování reaktivních skupin jako jsou $-OH$, $-NH_2$, $-SH$ (Katzung a kol., 2012), přičemž s transformovaným xenobiotikem se pak ve fázi II konjugují malé endogenní sloučeniny pro zvýšení jeho polarity. V tzv. fázi III dochází k migraci hydrofilních molekul z buňky (Hoffmann a kol., 2014). Biotransformace xenobiotik je katalyzována omezeným počtem enzymů se širokou substrátovou specifitou, jejichž exprese je u většiny konstitutivní, ale může být i indukovaná, a to obvykle vysokou koncentrací xenobiotika (Parkinson A. a kol., 2017). Ve fázi I se uplatňují zejména monooxygenasy CYP a FMO (flavínové monooxygenasy), ale i epoxidasy, hydroxylasy a dehydrogenasy (Croom, 2012). Ve fázi II se uplatňují konjugací enzymy z několika velkých enzymových rodin, a to zejména glutathion-*S*-transferasy, UDP-glukuronosyltransferasy, sulfotransferasy, *N*-acetyltransferasy a methyltransferasy (Brunton a kol., 2011).

1.4.2 Cytochromy P450

Cytochromy P450 (CYP) jsou enzymy obsahující hemovou prostetickou skupinu (protoporfyrín IX), která je v molekule proximálně koordinována thiolovou skupinou (Dawson a Sono, 1987). Thiolátový ligand je zodpovědný za typickou Soretovu absorpci cytochromů P450 při 450 nm v komplexu Fe^{II} -CO (Ortiz de Montellano, 2005). Cytochromy P450 se rozdělují dle sekvenční podobnosti na rodiny (sekvenční podobnost ≥ 40 %) a podrodiny (sekvenční podobnost ≥ 55 %). Například CYP3A4 je čtvrtým enzymem z podrodiny A, která patří do čtvrté rodiny (Nelson a kol., 1993). Eukaryotické CYP rodiny I jsou lokalizovány v mitochondriální membráně a u savců mají funkci zejména syntézy steroidních hormonů a vitamínu D₃. Eukaryotické CYP rodiny II jsou lokalizovány ve vnější membráně endoplasmatického retikula (ER) spolu s NADPH -

cytochrom P450 reduktasou, které jsou však v membráně umístěny samostatně (Werck-Reichhart a Feyereisen, 2000). Většina cytochromů P450 je vázána v ER hepatocytů, najdou se však i v extrahepatálních tkáních, jako jsou třeba plíce, ledviny, nadledviny (McQueen, 2018). Mezi lidskými jedinci rozeznáváme tzv. rychlé a pomalé metabolisátory některých léčiv, vzhledem k různému množství exprimovaných cytochromů P450 ve střevě a játrech. Některé jiné léky nebo třeba konzumace alkoholu a kouření mohou působit jako induktory, které způsobí změnu exprese cytochromů P450 (Hasler a kol., 1999).

Mechanismus monooxygenasové reakce katalyzované cytochromy P450 (Obr. 8) je následující. V prvním kroku se naváže substrát, který nahradí molekulu rozpouštědla (vody), přičemž dochází ke změně spinového stavu a redoxního potenciálu enzymu. V dalším kroku dochází k první jednoelektronové redukci, přičemž se oxidační stav iontu železa mění z III na II a zvyšuje se jeho redoxní potenciál. Následuje navázání kyslíku za vzniku superoxidového anionradikálu. Další redukcí vznikají aktivované kyslíkové sloučeniny, přičemž dochází ke štěpení vazby O-O ve sloučenině uvedené jako [B] na Obr. 8 a za dodání dvou protonů vodíku a odtrhnutí jednoho atomu kyslíku vzniká molekula vody a Sloučenina I, na Obr. 8 uvedená jako [C]. V reakci molekuly substrátu se Sloučeninou I, na Obr. 8 uvedená jako [C] dochází k inkorporaci druhého atomu kyslíku do molekuly substrátu za vzniku hydroxylovaného produktu (Werck-Reichhart a Feyereisen, 2000).



Obrázek 8: Mechanismus monooxygenasové reakce katalyzované cytochromy P450. Převzato a upraveno dle (Werck-Reichhart a Feyereisen, 2000).

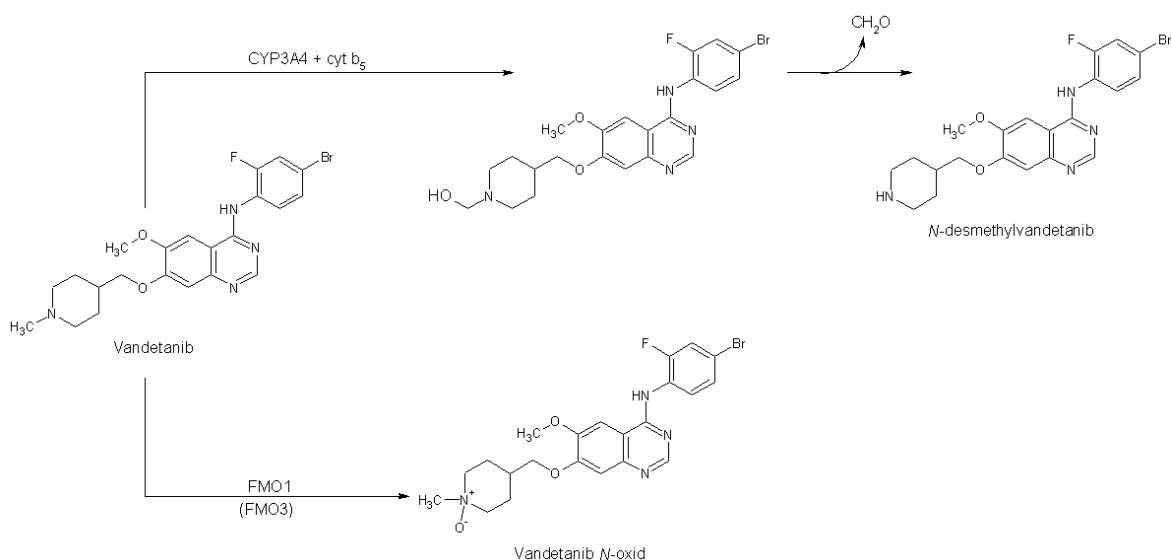
Donorem elektronu z NADPH pro cytochrom P450 je NADPH:cytochrom P450 oxidoreduktasa lokalizovaná v membráně ER a je obligatorní pro katalýzu zprostředkovanou cytochromy P450 (Porter a Lee Elmore, 2002). Cytochrom b_5 zvyšuje účinnost enzymového systému CYP tím, že urychluje přísun druhého elektronu při katalýze (Hildebrandt a Estabrook, 1971), což je jednak rychlost určující krok reakce a jednak se tím zabrání tzv. „uncoupling“ reakci. Superoxidový anionradikál totiž může při pomalém dodání elektronu vytvořit dismutační reakcí dvou molekul oxidovaných cytochromů P450 peroxid vodíku a obnovit tak reagující enzym (Gruenke a kol., 1995). Role cytochromu b_5 při reakcích katalyzovaných cytochromy P450 se ukázala být důležitá při mnoha reakcích. V případě proměny 7-ethoxykumarinu pomocí jaterních mikrosomů se koncentrace produktu při inhibici cytochromu b_5 protilátkami snížila na 20% (Noshiro a kol., 1979).

1.4.3 Flavinové monooxygenasy (FMO)

Flavinové monooxygenasy (FMO) jsou důležitou skupinou enzymů pro metabolismus léčiv, přičemž doplňují metabolismus léčiv katalyzovaný cytochromy P450 (Cruciani a kol., 2014). Cytochromy P450 využívají elektrofilní reakce probíhající prostřednictvím radikálových intermediátů, FMO metabolisují léčiva nukleofilní adicí (Cashman, 2000). Redukovaný flavin ve FMO rychle reaguje s kyslíkem za vzniku peroxyflavinu, který v tomto stavu čeká na vhodný nukleofilní substrát. Po nukleofilním ataku substrátu dochází k inkorporaci jednoho atomu kyslíku do substrátu a jeden atom kyslíku vytváří molekulu vody (Williams a Krueger, 2005). Do dnešní doby bylo objeveno šest lidských isoform FMO (Glieder A. a kol., 2018). FMO 1 hraje důležitou roli v extrahepatálním metabolismu xenobiotik u dospělých jedinců (přítomna zejména ve střevě a ledvinách) a hepatální metabolismus u plodu *in utero* (Williams a Krueger, 2005). FMO 3 zabezpečuje metabolismus xenobiotika v játrech dospělých jedinců (Dolphin a kol., 1996).

1.4.4 Metabolismus vandetanibu

Je důležité poznat metabolismus vandetanibu, jelikož oxidační metabolity vandetanibu *N*-desmethylvandetanib a vandetanib *N*-oxid mohou mít rozdílnou farmakologickou účinnost než vandetanib. Oxidace vandetanibu je katalyzována zejména CYP3A4 (příbalový letáček léčiva Caprelsa® (vandetanib), 2014; Martin a kol., 2011) Kromě toho byla provedena v naší laboratoři rozsáhlá studie, kde bylo zjištěno, že kromě CYP3A4 je vandetanib oxidován na *N*-desmethylvandetanib (Obr. 9) CYP2D6, 2C8, 1A1 a 3A5 dle procentuálního zastoupení v uvedeném pořadí. Co se týče lidských flavinových monooxygenas (FMO), je metabolisován formami FMO1 a FMO 3 na vandetanib *N*-oxid (Obr. 9) (Indra a kol., rukopis připravený k publikaci).



Obrázek 9: Metabolismus vandetanibu. Převzato z (Indra a kol., rukopis připravený k publikaci).

1.5 NANOČÁSTICE A JEJICH VYUŽITÍ PŘI LÉČBĚ NÁDOROVÝCH ONEMOCNĚNÍ

Chemoterapeutika na bázi nanočástic mají oproti volným léčivům mnoho výhod. Jednou z hlavních výhod chemoterapeutik na bázi nanočástic je cílení léčby specificky do nádorové tkáně. Díky tomu, že nádorové tkáně mají cévní systém slabě rozvětvený, špatně uspořádaný a cévní endotel obsahuje velké póry dosahující někdy až kolem několika stovek nanometrů na rozdíl od zdravého endotelu, kde se velikost póru pohybuje kolem 5-

10 nm, umožňují tím selektivní přístup pro makromolekulární léčiva (Hashizume a kol., 2000). Navíc, v nádorových tkáních také dochází ke zvýšené zadržování makromolekul vzhledem ke snížené činnosti lymfatických cév a dochází k selektivní retenci látek v nádorové tkáni. Tento efekt byl demonstrován na ukládání makromolekul rozpuštěných v lipidovém kontrastním médiu, přičemž se tento efekt se může využít jak při léčbě, tak při diagnostice nádorových onemocnění (Iwai a kol., 1984). Další výhodou chemoterapeutik na bázi nanočástic je schopnost enkapsulace a zvýšení rozpustnosti protinádorového léčiva (Wang a kol., 2012). „Multidrug“ (mnohočetná léková) resistance je problémem většiny neúspěšných případů léčby chemoterapií, kdy dochází k „vypumpování“ léčiva z buňky prostřednictvím vysoké exprese P-glykoproteinu (Ambudkar a kol. 1999). Přípravou léčiva ve formě nanočástic je možné se vyhnout „multidrug“ (mnohočetné lékové) resistenci, a to zejména „maskováním“ kladného náboje daného léčiva pomocí enkapsulace do vhodného nanotransportéru, díky čemuž molekula léčiva není rozeznána P-glykoproteinem (Bennis a kol. 1994). Anorganické nanočástice mají ještě další vlastnosti jako je například odpověď na magnetické stimuly, které se dají využít při diagnostice pomocí magnetické resonance (Estelrich a kol., 2015), při magnetickém cílení léčiv do nádorové tkáně (Mehta a kol., 2018) a nebo při termálním „heatingu“ nádorové tkáně (Espinosa a kol., 2016).

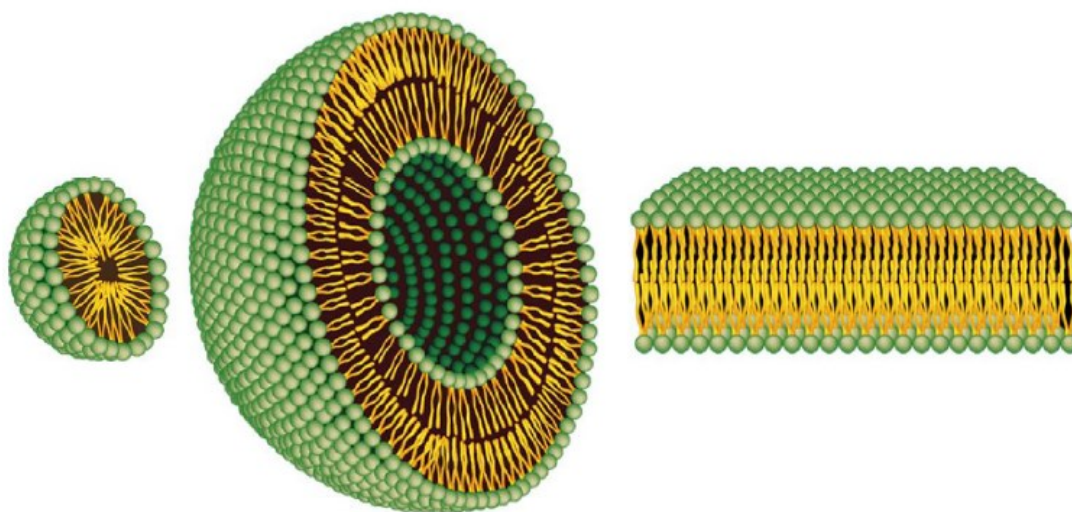
Kromě pasivního cílení chemoterapeutik v důsledku zvýšené permeability cév v nádorové tkáni a retence se mohou nanočástice cílit i aktivně, a to pomocí protilátek, resp. ligandů, vázaných na povrchu nanočástice. Receptor, resp. antigen na povrchu buňky, na který se váže protilátka, resp. ligand na povrchu nanočástice by měl být exprimován pouze nádorovými buňkami a také by měl být exprimován homogenně na všech nádorových buňkách (Cho a kol., 2008).

Na vychytávání, transport a akumulaci v buňce má největší vliv velikost nanočástice (Zhu a kol., 2013). Optimální se ukázala být velikost nanočástic kolem 50 nm (Chithrani a kol., 2006). Mezi důležité vlastnosti nanočástic patří také povrchový náboj nanočástice, který interaguje s nábojem cytoplasmatické membrány (Zhu a kol., 2013). V případě počítačové simulace s kladně nabitými částicemi docházelo k vyšší interakci mezi nanočásticemi a cytoplasmatickou membránou, přičemž docházelo ke vrásnění membrány, které vede k endocytose nanočástic (Gu a Li, 2010). Na rozdíl od kladně nabitých částic, hydrofobní nanočástice interagují s hydrofobní vnitřní složkou membrány, což vede k její absorpci bez porušení fosfolipidové membrány (Li a kol. 2008). Kromě velikosti částice a jejího povrchového náboje je důležitý také jejich tvar. Například

v případě zlatých nanočástic byly absorbovány cytoplasmatickou membránou lépe částice s kulovitým tvarem než částice s tyčinkovitým tvarem (Chan a Chithrani, 2007). Na určení velikosti nanočástic jsou vhodné techniky jako SEM (Scanning Electron Microscopy), TEM (Transmission Electron Microscopy), XRD (X-Ray Diffraction) a AFM (Atomic Force Microscopy). Povrchový náboj molekuly se dá měřit pomocí technik ELS (Electrophoretic Light Scattering) nebo TRPS (Tunable Resistive Light Sensing) (Sikora a kol., 2016).

1.5.1 Lipidové nanočástice

Liposomy jsou nanočástice kulovitého tvaru, které se spontánně vytváří ve vodném prostředí za vzniku lipidové dvojvrstvy, která je obklopena vodným prostředím (Obr. 10) (Cho a kol., 2008).



Obrázek 10: Zobrazení micely (vlevo), liposomu (uprostřed) a lipidové dvouvrstvy (vpravo). Převzato z (Bozzuto a Molinari, 2015).

Nejčastější stavební jednotkou biologických membrán jsou fosfoglyceridy, a to konkrétně fosfatidylcholin. Částice fosfatidylcholinu jsou ve vodě nerozpustné a vytváří strukturu lipidové dvouvrstvy pro minimalizaci kontaktu s vodnou fází (Daraee a kol., 2014). Liposomy jsou téměř ideální transportérové částice pro různá léčiva, jelikož dokážou zachytit jak hydrofilní látky do vodného nitra nebo hydrofobní látky do lipidové membrány a také mají morfologii podobnou buněčným membránám (Bozzuto a Molinari,

2015). Mezi léčiva ve formě liposomů, které schválila US Food and Drug Administration (FDA) patří například protinádorová léčiva daunorubicin (DaunoXome[®]) (Rosenthal a kol., 2002), který se využívá při léčbě Kaposiho sarkomu a nebo doxorubicin (Doxil[®], Myocet[®]) (Markan, 2006), který se využívá při léčbě rakoviny prsu a vaječníku.

1.5.2 Nanočástice na bázi proteinů

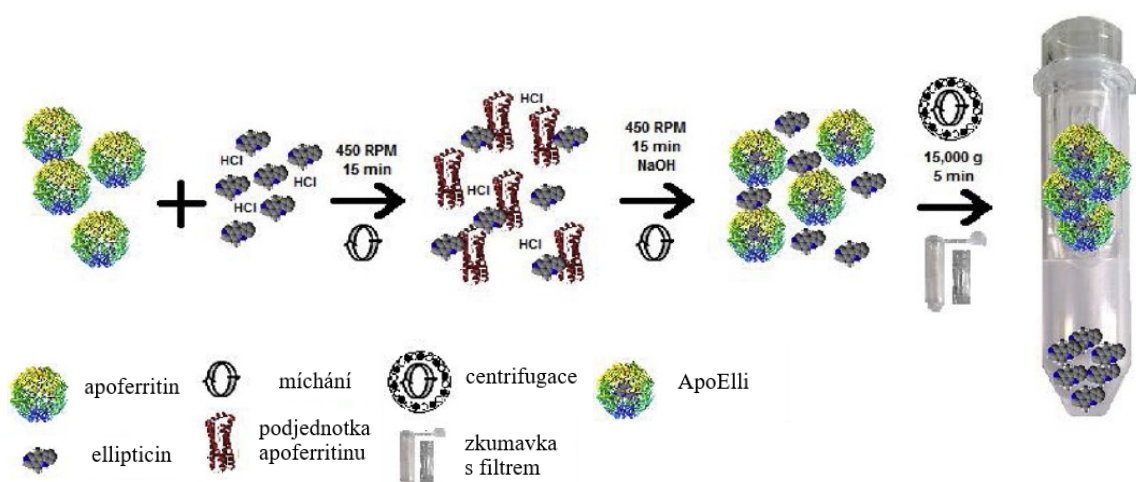
Nanočástice na bázi proteinů jsou tvořeny proteiny nebo kombinací proteinů, které jsou složeny z podjednotek schopných spontánní asociace. Díky biokompatibilitě a nízké toxicitě jsou výbornou platformou pro transport léčiv (Ma-Ham a kol., 2009). Pro účely cíleného transportu protinádorových léčiv byly využity různé typy proteinů. Mezi nimi například cytostatikum ellipticin vázané v apoferritinu (Indra a kol., 2019), cytostatikum mitoxantrone ve viru tabakové mozaiky (Steinmetz a Lin, 2018), nebo cytostatikum paclitaxel vázané v albuminu (Abraxan[®]), které bylo schváleno US Food and Drug Company (FDA) (Miele a kol., 2009).

1.5.2.1 Nanočástice na bázi apoferritinu

Ferritin je protein tvořený 24 podjednotkami, jehož podjednotky spontánně asociují za vytvoření kulovité struktury s dutinou uvnitř (Ford a kol., 1984). Funkcí ferritinu je oxidace iontů Fe^{II} , jejichž hromadění by mohlo být pro organismus toxické, na ionty Fe^{III} a následná tvorba micel hydratovaného fosfátu železitého ($[\text{FeOOH}]_8 [\text{FeOPO}_3\text{H}_2]$) (Harrison a kol., 1974). Ve struktuře ferritinu rozlišujeme dva typy řetězců, a to L a H řetězce, které se liší ve své funkci. H řetězce mají Fe^{II} - oxidasovou aktivitu (Lawson a kol., 1989) a L řetězce inkorporují ionty železa (Levi a kol., 1994). Vnější průměr apoferritinu má velikost ~12,5 nm, vnitřní průměr má velikost ~7-8 nm (Liu a kol., 2006). Ferritin je odolný vůči extrémně vysokým teplotám (75-85°C) (Chen a kol., 2008). Intaktní sférická struktura ferritinu, resp. apoferritinu s dutinou zůstává zachovaná v širokém intervalu pH (3,4-10) (Kim a kol., 2011).

Apo ferritin se svými vlastnostmi ukázal být vhodný pro enkapsulaci protinádorových léčiv a jejich specifického cílení do nádorových tkání. Bylo zjištěno, že ferritin je asociovaný s některými nádorovými tkáněmi, které mají na povrchu receptory specifické pro ferritin (Konijn a kol., 1990; Bretscher a Thomson, 1983). Kromě toho lze

povrch apoferritinu protilátkami pro dosažení specifitějšího cílení (Heger a kol., 2014). Studie z roku 2005 ukázaly, že apoferritin je schopný enkapsulovat protinádorové léčivo, konkrétně doxorubicin (Simsek a Kilic, 2005). Následně byly připraveny nanočástice s vyšším množstvím doxorubicinu enkapsulovaného v apoferritinu (Kilic a kol., 2012). Doxorubicin enkapsulovaný v apoferritinu přitom vykazuje vysokou stabilitu při různých teplotních podmínkách (-20°C, 4°C, 20 °C a 37°C) během 12 týdnů (Dostalova a kol., 2017). Také byla provedena enkapsulace dalších protinádorových léčiv do apoferritinu, a to zejména daunomycinu (Ma-Ham a kol., 2011), ellipticinu (Indra a kol., 2019) a protinádorová léčiva na bázi platiny (cisplatina a karboplatina) (Yang a kol., 2007). Při přípravě nanočástic apoferritinu s enkapsulovanými protinádorovými léčivy se využívá pH senzitivity apoferritinu. Podjednotky apoferritinu disociují v kyselém pH ($\text{pH} \leq 3,24$) a následně reasociují při neutrálním pH (Kim a kol., 2011). Schéma přípravy je uvedena na Obr. 11.



Obrázek 11: Příprava nanočástic ellipticinu enkapsulovaného v apoferritinu. Převzato a upraveno dle (Indra a kol., 2019).

1.6 KLASICKÁ MOLEKULÁRNÍ DYNAMIKA

1.6.1 Pohybové rovnice

Časový vývoj biomolekulárních systémů v klasických molekulárně - dynamických (MD) simulacích určují Newtonovy pohybové rovnice:

$$m_{\alpha} \cdot \ddot{\vec{r}}_{\alpha} = - \frac{\partial}{\partial \vec{r}_{\alpha}} U_{celková}(\vec{r}_1, \vec{r}_2, \dots, \vec{r}_N) \quad \alpha = 1, 2, \dots, N, \quad (1)$$

kde m_{α} je hmotnost atomu, \vec{r}_{α} je poloha atomu, $U_{celková}$ je celková potenciální energie simulovaného systému závisající na poloze jednotlivých atomů. Díky celkové potenciální energii $U_{celková}$ je pohyb všech atomů propojen. Pohyb každého jednoho atomu totiž ovlivňuje síla, která je součtem mnoha dílčích příspěvků interakcí se všemi ostatními atomy v simulovaném systému.

1.6.2 Silové pole – Force field

Celková potenciální energie $U_{celková}$ je v klasických MD simulacích representována pomocí funkce (tzv. „silového pole“ či „force fieldu“). Obvykle jde o součet příspěvků různého typu:

$$U_{celková} = U_{vazebná} + U_{uhlová} + U_{dihedrál ní} + U_{vdW} + U_{Coulombická} \quad (2)$$

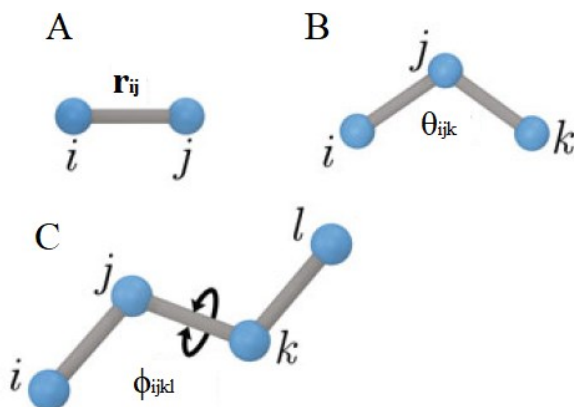
První tři složky nálež í vazebným interakcím a určují změnu potenciální energie při vychýlení délek kovalentních vazeb či velikostí úhlů a dihedrálních úhlů z optimálních hodnot:

$$U_{vazebná} = \sum_{vazby\ i} k_i^{vazba} \cdot (r_i - r_{0i})^2 \quad (3)$$

$$U_{uhlová} = \sum_{vazebné\ uhly\ i} k_i^{vazební\ uhel} \cdot (\theta_i - \theta_{0i})^2 \quad (4)$$

$$U_{dihedrál ní} = \sum_{dihedrál ní\ uhly\ i} \begin{cases} k_i^{dihe} [1 + \cos(n_i \theta_i - \gamma_i)], n_i \neq 0 \\ k_i^{dihe} (0_i - \gamma_i)^2 n = 0 \end{cases} \quad (5)$$

Vazby v rovnici (3) jsou tedy všechny kovalentní vazby v simulovaném systému. Vazebné uhly v rovnici (4) jsou uhly mezi všemi páry sousedních kovalentních vazeb, které sdílejí jeden atom. Dihedrál ní úhel v rovnici (5) je úhel mezi dvěma kovalentními vazbami, které spojuje jedna další centrální kovalentní vazba, vůči které se dihedrál ní úhel vztahuje. Jednotlivé vazebné interakce jsou zobrazeny na Obr.12.



Obrázek 12: Vazebné interakce. A) kovalentní vazba s délkou r_{ij} mezi atomy i a j . B) vazebný uhel θ_{ijk} mezi kovalentními vazbami ij a jk . C) dihedrální uhel ϕ_{ijkl} jež svírají vazby ij a kl při pohledu podél vazby jk . Převzato z (Solovyov a kol., 2017).

Poslední dvě složky v silovém poli (2) popisují tzv. nevazebné interakce mezi dvojicemi atomů, které nespojují kovalentní vazby:

$$U_{vdW} = \sum_i \sum_{j>i} 4\varepsilon_{ij} \left[\left(\frac{\sigma_{ij}}{r_{ij}} \right)^{12} - \left(\frac{\sigma_{ij}}{r_{ij}} \right)^6 \right] \quad (6)$$

$$U_{Coulombická} = \sum_i \sum_{j>i} \frac{q_i q_j}{4\pi\varepsilon_0 r_{ij}} \quad (7)$$

Rovnice (6) popisuje van der Waalsovy interakce aproximované Lennardovým-Jonesovým 6-12 potenciálem. Rovnice (7) vyjadřuje elektrostatické interakce, které vznikají v důsledku parciálních bodových nábojů na jednotlivých atomech.

Soubory konkrétních parametrů (tzv. silových konstant a rovnovážných hodnot), které vystupují ve vazebných (3-5) i nevazebných (6-7) členech silového pole (2) (např. k_i^{vazba} , r_{0i} , atd.), pro všechny atomy vyskytující se v různých typech biomolekul (nukleových kyselinách, proteinech, lipidech atd.) jsou obvykle seskupeny v rozsáhlých textových souborech s definovaným formátem tak, aby je konkrétní simulační program mohl automaticky načíst. Stanovení těchto parametrů (parametrisace silových polí) se od konce 60. let provádělo empiricky na základě experimentálních dat (Lifson a Warshel, 1968). V posledních dekádách převažuje „fitování“ silových polí na základě kvantově-mechanických výpočtů prováděných pro malé modelové systémy (Mayne a kol., 2013). Správnost získaných parametrů se následně ověřuje reprodukcí strukturních, dynamických

a termodynamických vlastností malých molekul, které byly dobře experimentálně charakterizovány.

1.6.3 Výpočet nevazebných interakcí

U Lennardova-Jonesova potenciálu, který relativně rychle vyhasíná, je krátkodosahový, lze zvolit mez (cca. 12 Å), za kterou už se příspěvky od párových interakcí atomů nebudou započítávat. V případě pomalu vyhasínající dalekodosahové Coulombické interakce to ale není možné. Při MD simulacích se obvykle používají tzv. periodické okrajové podmínky. Simulovaný box s biomolekulou a vodnou obálkou se obklopí virtuálními kopiemi sebe sama. Tím se jednak zabráni artefaktům na okraji simulovaného systému. Navíc je ale možné díky periodičnosti výsledného simulovaného systému použít tzv. Ewaldovu sumaci pro výpočet dalekodosahových Coulombických interakcí (Phillips, 2005).

1.6.4 Numerická integrace pohybových rovnic

Pro numerickou integraci Newtonových pohybových rovnic se používají různé varianty tzv. Verletova algoritmu (Verlet, 1967), který funguje na principu získávání nových rychlostí a poloh částic (v_{n+1}, r_{n+1} na základě starých poloh a rychlostí (v_n, r_n) a na základě vzájemného silového působení $F_n = F(r_n)$. Je možné použít např. následující vztahy:

$$\text{„half-kick“} \quad v_{n+1/2} = v_n + M^{-1}F_n\Delta t/2,$$

$$\text{„drift“} \quad r_{n+1} = r_n + v_{n+1/2} \cdot \Delta t,$$

$$\text{„počítání síly“} \quad F_{n+1} = F(r_{n+1}),$$

$$\text{„half-kick“} \quad v_{n+1} = v_{n+1/2} + M^{-1}F_{n+1}\Delta t/2,$$

kde M je hmotnost. Tato varianta Verletova algoritmu se občas nazývá metoda *half-kick/drift/half-kick*. Nejprve se totiž při výpočtu rychlostí použije poloviční časový krok. Následuje volný let částice s hybností $p_{n+1/2}$ po celý časový krok. Nakonec se provede ještě jeden časový půlkrok při výpočtu rychlostí (Sutmann, 2010). A to vše se mnohokrát opakuje.

MD simulace biomolekulárních systémů obvykle vyžadují propočtení minimálně několik milionů časových kroků. Používá se časový krok o délce 1-5 fs a výsledné trajektorie mají délku ns či μ s (s využitím speciálního hardwaru i ms). Pro zefektivnění numerické integrace lze použít různě velký časový krok pro jednotlivé složky silového pole uvedené v rovnici (2). Pomalu se měnící síly se přepočítávají s menší frekvencí než ty rychle se měnící. Lze použít např. tři různé integrační smyčky. Vnitřní smyčku pro vazebné interakce, střední smyčku pro Lennardův-Jonesův potenciál a krátkodosahové elektrostatické interakce a vnější smyčku pro dalekodosahové elektrostatické interakce (Phillips, 2005).

Pokud se na pohybové rovnice aplikuje pouze Verletův algoritmus, vede to k tzv. NVE systému s konstantním množstvím částic (N), objemem (V) a energií (E). Obvykle se ale zavádějí ještě tzv. termostaty (NVT) a barostaty (NPT), aby bylo možné kontrolovat teplotu a tlak simulovaného systému (Phillips, 2005).

1.6.5 Software a hardware použitý pro molekulárně – dynamické simulace

Při řešení této diplomové práce bylo použito několik softwarových balíků. Pro přípravu simulovaných systémů bylo použito grafické rozraní VMD (Humphrey, 1996), které doplňuje simulační program NAMD (Phillips, 2005), jenž byl použit pro kratší MD simulace. Pro delší MD simulace byl použit softwarový „balík“ AMBER (Salomon-Ferrer, 2013), který vyniká výkonem na výpočetních grafických kartách. Byla použita silová pole CHARMM (Chemistry at HARvard Macromolecular Mechanics – Vanommeslaeghe K., 2015) a AMBER (Assisted Model Building with Energy Refinement), s nimiž mohou pracovat oba výše uvedené simulační programy (NAMD a AMBER). MD simulace byly realizovány prostřednictvím hardwarových prostředků dostupných v superpočítačovém MetaCentru (metavo.metacentrum.cz). Program VMD byl použit i pro vizualizaci a analýzu všech MD trajektorií. Další podrobnosti jsou uvedeny v metodické části této práce – viz. kap. 3.3.1 *Počítačové modelování enkapslace léčiv do dutiny apoferritinu.*

2. CÍL DIPLOMOVÉ PRÁCE

Cílem předkládané diplomové práce bylo poznání možných cest vedoucích ke zvýšení účinku protinádorového léčiva lenvatinibu, konkrétně přípravou tohoto léčiva ve formě nanotransporterů. Lenvatinib se využívá k léčbě rakoviny štítné žlázy, kde působí jako inhibitor tyrosinkinas. Dalším cílem práce bylo studium metabolismu protinádorového léčiva vandetanibu, který se jako inhibitor tyrosinkinas taktéž využívá při léčbě nádorového onemocnění štítné žlázy. Rozšíření poznatků o metabolismu tohoto léčiva předpokládáme ve využití zvýšení jeho účinnosti při léčbě. Jednotlivé cíle práce je možné shrnout do následujících bodů:

- Vypracování metody pro přípravu lenvatinibu ve formě nanočástic apoferritinu (ApoLen) a ve formě lipidových (liposomálních) nanočástic
- Studium metabolismu vandetanibu lidskými cytochromy P450 1A1, 2D6 a 3A4
- Využití teoretických přístupů počítačového modelování doplňujících výše uvedené experimentální cíle

3. MATERIÁL A METODY

3.1 PŘÍSTROJE A MATERIÁL

Automatické pipety: *Nichiryo, Nichipet EX* (Japonsko); *Eppendorf Reference* (Německo); *Thermo Scientific, Finnpiptette F1* (Finsko)

Analytické váhy: *Discovery, Ohaus* (Švýcarsko)

Magnetická míchačka: *KMO 2 basic, IKAWERKE* (Německo)

pH metry: pH metr *ATI Orion 370* s kombinovanou elektrodou *ATI Orion* (USA), kalibrace pomocí standardů *Hamilton* (Švýcarsko); pH metr *Thermo Scientific ORION STAR A111* (USA), elektroda *Hamilton Minirode* (Švajčiarsko), kalibrace pomocí standardů *Thermo Scientific ORION products* (USA)

Centrifugy: *Centrifuge 5418, Eppendorf*, úhlový rotor (Německo); *SpectrafugeTM mini-centrifuge blue, Labnet* (USA)

Filtrační mikozkumavky: *Amicon[®] Ultra - 0.5 ml 3K* (Merck Millipore, Billerica, MA, USA), *Amicon[®] Ultra - 0.5 ml 100K* (Merck Millipore, Billerica, MA, USA)

Třepačka: *Thermomixer compact Eppendorf* (USA)

Sonikátor: *ELMAsonic E30H, P-lab* (Česká republika)

Vortex: vortex mixer *S0200 Model VX-200, Labnet* (USA)

Rotační vakuová odparka: *Labconco, CentriVap Concentrator* (USA)

Vakuová pumpa: *Kd Scientific* (USA)

Filtrační systém: *MiliPore DuraporeTM*, 0,22 µm (Merck, USA)

HPLC: *UltiMate 3000, Thermo Scientific Dionex* (USA): *RS Pump, RS Autosampler, RS Fluorescent Detector, RS Diode Array Detector, RS Column Compartment, RS Degasys kolona: Nucleosil 100-5, C18, 250 x 4 mm, 5 µm, Macherey- Nagel* (Německo)
program: *Chromeleon[®] 7*

3.2 CHEMIKÁLIE

Lachner, Česká republika

hexahydrát chloridu horečnatého ($\text{MgCl}_2 \cdot 6 \text{H}_2\text{O}$); ethyleneglykol; kyselina chlorovodíková; ethanol, dihydrogenfosforečnan draselný (KH_2PO_4)

VWR, USA

methanol; acetonitril

Sigma Aldrich, USA

apoferritin izolovaný z koňské sleziny ($c \approx 50 \text{ mg/ml}$); dimethylsulfoxid (DMSO); *N,N*-dimethylacetamid (DMA); dichlormethan; 1,2 - didodekanoyl-rac-glycero-3-fosfocholin (DLPC-rac); 1,2- didodekanoyl-*sn*-glycero-3-fosfocholin (DLPC-*sn*)

Penta, Česká republika

octan amonný; hydroxid sodný

Roche, Německo

redukováný nikotinamidadenindinukleotid fosfát (NADPH), sodná sůl

BD Bioscience, USA

rekombinantní cytochromy P450 exprimované v hmyzích buňkách (SupersomyTM): CYP1A1; CYP2D6; CYP3A4; CYP3A4 + cytochrom *b*₅

LC laboratories, USA

lenvatinib, vandetanib

3.3 METODY

3.3.1 Počítačové modelování enkapsulace léčiv do dutiny apoferritinu

Všechny počítačové simulované systémy byly vytvořeny prostřednictvím softwarového balíku VMD (Humphrey, 1996). Počítačové modelování bylo prováděno na Oddělení fyziky biomolekul pod vedením RNDr. Ivana Barvíka, Ph. D. na Matematicko - fyzikální fakultě UK.

Počáteční struktura apoferritinu z koňské sleziny byla získaná z proteinové databanky (PDB id 2W0O) a byla parametrisovaná prostřednictvím silového pole CHARMM (Vanommeslaeghe, 2015). Počáteční struktury ellipticinu, lenvatinibu a DMA byly postaveny pomocí modulu Molefactory ze softwarového balíku VMD 1.9.3 (Humphrey, 1996). Jejich geometrie byly optimalisované prostřednictvím semiempirického kvantově-mechanického výpočtu (SQM) a byly naparametrisované prostřednictvím serveru SwissParam (Zoete, 2011).

Simulované systémy uvedené v tab. 1 byly obklopeny vodnou obálkou sestávající z molekul vody, které podél všech os přesahovaly molekulu apoferritinu o cca. 10 Å. Vznikl tak kvádr o rozměrech, které jsou uvedeny v tab. 1. Byly aplikovány periodické okrajové podmínky. Sousední obrazy apoferritinu tak vždy oddělovala cca. 20 Å silná vrstva molekul vody, které byly representovány prostřednictvím silového pole TIP3P (Jorgensen, 1983).

Pro simulaci distribuce léčiv ellipticinu a lenvatinibu uvnitř dutiny apoferritinu byly vytvořeny systémy sestávající z molekul ellipticinu nebo lenvatinibu v protonované, resp. neutrální formě a struktury apoferritinu (systémy “distribuce lenvatinib neutrální”, “distribuce lenvatinib protonovaný”, “distribuce ellipticin neutrální” a “distribuce ellipticin protonovaný”). Následně byly systémy solvatovány, jak je uvedeno výše. V případě systémů, kde jsme sledovali distribuci lenvatinibu uvnitř dutiny apoferritinu byla koncentrace léčiva 1,17 mM. V případě systémů, kde jsme sledovali distribuci ellipticinu uvnitř dutiny apoferritinu byla koncentrace léčiva přibližně 1,54 mM.

Pro simulaci enkapsulace léčiv ellipticinu a lenvatinibu dovnitř dutiny apoferritinu byly vytvořeny systémy pozůstávající z tzv. „děravé“ struktury apoferritinu, kde byla vynechána jedna podjednotka z celkových 24 podjednotek. Tato struktura byla na počátku simulace obklopena molekulami ellipticinu nebo lenvatinibu v protonované, resp. neutrální

formě (systémy “enkapsulace lenvatinib neutrální”, “enkapsulace lenvatinib protonovaný”, “enkapsulace ellipticin neutrální” a “enkapsulace ellipticin protonovaný”). Následně byly systémy solvatovány, jak je uvedeno výše. Koncentrace lenvatinibu byla opět přibližně 1,17 mM a ellipticinu 1,54 mM.

Tabulka 1: Simulované systémy

Systém	Celkový počet atomů	Počet atomů rozpouštědla	Periodické okrajové podmínky X-Y-Y [Å]
Solvatovaný apoferritin	273 336	208 224	142.4 - 142.2 - 144.3
Solvatovaný ellipticin neutrální	1859	1710	44.17 - 25.27 - 22.88
Solvatovaný ellipticin protonovaný	1417	1383	29.95 - 27.9 - 21.44
Solvatovaný lenvatinib neutrální	2551	2502	33.95 - 29.82 - 28.5
Solvatovaný lenvatinib protonovaný	2551	2502	40.76 - 23.99 - 21.91
Solvatované DMA	7307	6492	44,35 - 41,8 - 47,08
Solvatačný box DMA/voda	719 250	484 875	217,58 - 219,05 - 219,77
Distribuce ellipticin neutrální	251 406	201 231	139.11 - 140,01 - 141,07
Distribuce ellipticin protonovaný	251 640	178 572	256,67 - 217,76 - 232,57
Distribuce lenvatinib neutrální	734 897	451 269	199,31 - 200,13 - 200,74
Distribuce lenvatinib protonovaný	735 397	539 917	199,32 - 200,13 - 200,74
Ekapsulace ellipticin neutrální	937 346	862 935	227,66 - 198,87 - 212,80
Ekapsulace ellipticin protonovaný	937 710	862 935	227,72 - 198,92 - 212,86
Ekapsulace lenvatinib neutrální	715 828	643 188	196,13 - 196,14 - 196,02
Enkapsulace lenvatinib protonovaný	716 037	643 188	195,42 - 196,43 - 196,31

Přípravné MD trajektorie byly vyprodukovány prostřednictvím softwarového balíku NAMD (Phillips, 2005).

Přípravné MD simulace, které byly použity pro zobrazení distribuce protinádorových léčiv uvnitř dutiny apoferritinu, byly realizované při teplotě 310 K v

superpočítačovém MetaCentru (<https://metavo.metacentrum.cz>). Byl aplikován Langevinův termostat a Langevinův-Hooverův barostat pro kontrolu teploty a tlaku. VdW interakce byly započítávány do vzdálenosti 12 Å. Dalekodosahové elektrostatické interakce byly spočteny pomocí Ewaldovy sumace (Cheatham, 1994). Podmínky pro minimalisace a přípravné MD simulace jsou uvedeny v tab. 2.

Tabulka 2: Podmínky pro minimalisace a přípravné MD simulace provedené prostřednictvím softwarového balíku NAMD

Systém	<i>N</i> kroků minimalisace	Délka simulace
Solvatovaný apoferritin	1000	500 ps
Solvatovaný ellipticin neutrální	2500	500 ps
Solvatovaný ellipticin protonovaný	2500	5 ps
Solvatovaný lenvatinib neutrální	2500	5 ps
Solvatovaný lenvatinib protonovaný	2500	5 ns
Solvatované DMA	2500	5 ns
Solvatačný box DMA/voda	2500	5 ns
Distribuce ellipticin neutrální	1000	5 ns
Distribuce ellipticin protonovaný	2500	5 ns
Distribuce lenvatinib neutrální	1000	5 ns
Distribuce lenvatinib protonovaný	1000	5 ns

Dlouhé MD simulace, které byly použity pro model enkapsulace protinádorových léčiv do dutiny apoferritinu, byly vyprodukovány prostřednictvím softwarového balíku AMBER (Salomon-Ferrer, 2013).

Pro molekuly ellipticinu, lenvatinibu a *N,N*-dimethylacetamidu (DMA) bylo použito silové pole “Generalized Amber Force Field” (GAFF) (Wang, 2004). Parciální náboje na atomech byly spočteny pomocí semiempirické metody AM1-BCC (Jakalian, 2002). Vstupní soubory pro MD simulace *.inpcrd (souřadnice) a *.prmtop (molekulární topologie, silové pole) pro celé simulované systémy byly generované prostřednictvím modulu „tleap“ ze softwarového balíku AMBER (Salomon-Ferrer, 2013). Před vlastními MD simulacemi byla minimalisovaná celková energie simulovaných systémů pomocí modulu „pmemd“ ze softwarového balíku AMBER 14. Dlouhé produkční MD běhy byly realizovány prostřednictvím modulu „pmemd.cuda.MPI“ ze softwarového balíku AMBER

14. Modul „pmemd.cuda.MPI“ běží výhradně na grafických kartách (NVIDIA GPU), které poskytují výpočetní výkon ekvivalentní desítkám procesorových jader klasických CPU (Le Grand, 2013). K výpočtu elektrostatických interakcí byla využita Ewaldova sumace (Cheatham, 1994). VdW interakce byly započítávány do vzdálenosti 9 Å. Teplota byla udržována na 300 K pomocí Langevinovy dynamiky s tzv. frikčním faktorem s hodnotou 5. Pro kontrolu tlaku byl využit barostat na bázi metody Monte Carlo (novinka v AMBERu v. 14). Délka kovalentních vazeb s vodíkovými atomy byla fixována pomocí algoritmu SHAKE. Pro molekuly vody byl ke stejnému účelu využit algoritmus SETTLE (Miyamoto, 1992). Tzv. „hydrogen mass repartitioning“ schéma, kdy je hmotnost těžkých atomů částečně přenesena na navázané vodíkové atomy (s tím, že celková hmotnost simulovaného systému zůstane zachována), dovolilo zvětšit velikost časového integračního kroku ze 2 fs na 4 fs (Feenstra, 1999). Elektrostatický potenciál molekuly apoferritinu byl zobrazen pomocí modulu „PME Electrostatics“ v softwareovém balíku VMD 1.9.3 (Humphrey, 1996). Podmínky pro minimalisace a dlouhé produkční MD simulace jsou uvedeny v tab. 3.

Tabulka 3: Podmínky pro minimalisace a dlouhé produkční MD simulace provedené prostřednictvím softwarového balíku AMBER.

Systém	<i>N</i> kroků minimalisace	Délka simulace
Enkapsulovaný ellipticin neutrální	200	60 ns
Enkapsulovaný ellipticin protonovaný	200	40 ns
Ekapsulovaný lenvatinib neutrální	100	20 ns
Enkapsulovaný lenvatinib protonovaný	1000	18 ns

3.3.2 Příprava nanočástic lenvatinibu v apoferritinu

3.3.2.1 Výběr rozpouštědla pro přípravu nanočástic lenvatinibu v apoferritinu

Lenvatinib byl rozpouštěn v několika rozpouštědlech tak, abychom získali zásobní roztok o koncentraci 1 mg/ml nebo 10 mg/ml. Vzorky byly sonikovány 45 minut. Lenvatinib za koncentrace 10 mg/ml byl rozpustný pouze v DMSO a N,N-dimethylacetamidu (DMA). Koncentrace lenvatinibu 1 mg/ml byla získána rozpuštěním

této látky v ethylenglykolu, diethylenglykolu, methanolu a ethanolu. K uvedeným roztokům byla přidána buď deionisovaná voda nebo ethanol tak, aby výsledná koncentrace lenvatinibu byla ve všech vzorcích 0,33 mg/ml. Když byly vzorky rozpustné ve vodě, nebyly testovány z hlediska rozpustnosti v ethanolu vzhledem k tomu, že voda je jako rozpouštědlo oproti ethanolu netoxická. Ke vzorku lenvatinibu rozpuštěného v DMSO byl přidán 1 µl 1 M HCl, a to proto, aby zůstala koncentrace lenvatinibu (0,33 mg/ml) v požadovaném stavu. Lenvatinib zůstal rozpuštěný pouze po přidání ethanolu ke vzorkům lenvatinibu rozpuštěného v ethylenglykolu a lenvatinibu rozpuštěného v methanolu, po přidání vody s HCl ke vzorkům lenvatinibu rozpuštěného v DMSO a po přidání vody ke vzorkům lenvatinibu rozpuštěného v ethanolu a DMA (tab. 4). Ke vzorkům bylo dále přidáno 20 µl apoferritinu a bylo sledováno, zda v testovaných rozpouštědlech dojde k jeho denaturaci. Rozpustnost lenvatinibu a schopnost denaturace apoferritinu jednotlivých rozpouštědel je uvedena v tab. 4.

Tabulka 4: Rozpustnost lenvatinibu v reakčních směsích pro přípravu částic ApoLen

	Koncentrace [mg/ml]	Rozpustnost lenvatinibu po přidání ddH ₂ O	Rozpustnost lenvatinibu po přidání ethanolu	Denaturace apoferritinu po přidání ddH ₂ O	Denaturace apoferritinu po přidání ethanolu
DMSO	10	nerozpustný	rozpustný	X	denaturuje
DMSO	10	+1 µl HCl rozpustný	rozpustný	(pH~7) nedenaturuje	denaturuje
DMA	10	nerozpustný	rozpustný	X	denaturuje
ethylenglykol	1	nerozpustný	rozpustný	X	nedenaturuje
methanol	1	rozpustný	X	X	nedenaturuje
ethanol	1	ano	X	nedenaturuje	X
DMA	1	ano	X	nedenaturuje	X
Diethylen glykol	1	nerozpustný	nerozpustný	X	X

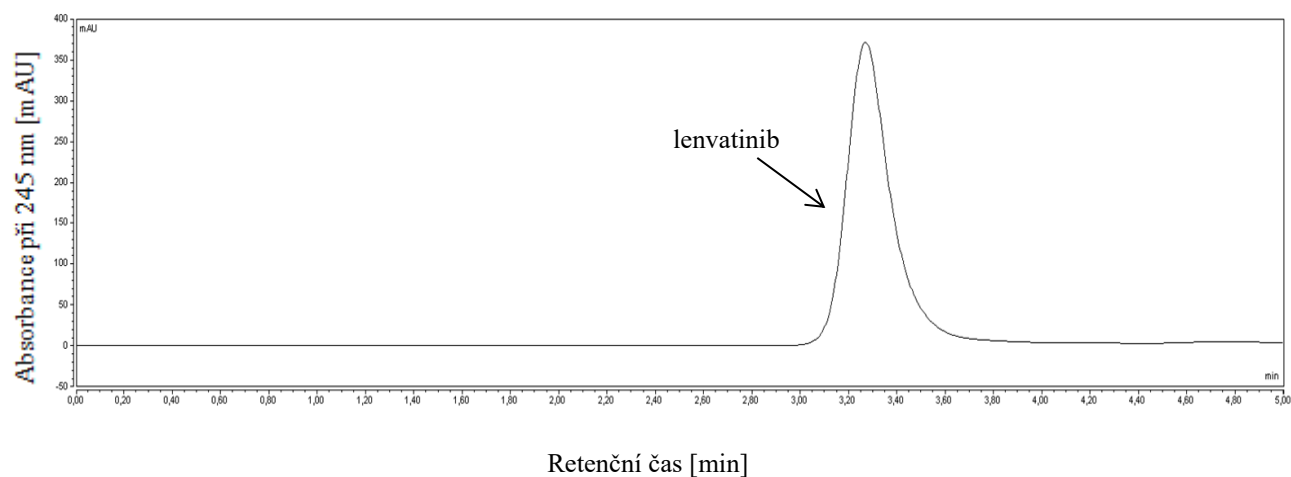
X: vzorky nebyly dále testovány

Ačkoli byl lenvatinib nejlépe rozpustný v DMSO v kyselém prostředí, a za těchto podmínek nedenaturoval apoferritin, v dalších experimentech pro přípravu částic ApoLen nebyl použit proto, že při proceduře se při finálním kroku používá změna pH na alkalické

(nutné k uzavření apoferritinových částic) a za těchto podmínek dochází k precipitaci lenvatinibu. Proto jsme pro další experimenty použili pro rozpuštění lenvatinibu ethylenglykol, ethanol, methanol a DMA.

3.3.2.2 Příprava nanočástic lenvatinibu v apoferritinu s použitím roztoku lenvatinibu rozpuštěného v ethylenglykolu, ethanolu a *N,N*-dimethylacetamidu

Všechny vzorky byly připraveny v dubletech. Ke 100 μ l zásobního roztoku lenvatinibu rozpuštěného v DMA ($c = 1$ mg/ml) a lenvatinibu rozpuštěného v ethanolu ($c = 1$ mg/ml) bylo pipetováno 200 μ l deionisované vody. Ke 100 μ l zásobního roztoku lenvatinibu rozpuštěného v ethylenglykolu ($c = 1$ mg/ml) bylo pipetováno 200 μ l ethanolu. Pak byly vzorky promíchány na míchačce vortex. Následně bylo přidáno 20 μ l roztoku apoferritinu a vzorky byly okyseleny pomocí 1 M HCl na pH ~ 3 . Potom byly inkubovány 15 min. za míchání při 400 RPM při laboratorní teplotě. Následně bylo pH upraveno pomocí 1 M NaOH na hodnoty 8 - 10 a vzorky byly poté opětovně inkubovány 15 min. za míchání při 400 RPM při laboratorní teplotě. Jako negativní kontrola byly připraveny vzorky bez přidání HCl, bez přidání HCl i NaOH a bez přidání apoferritinu. Vzorky připravené ze zásobního roztoku lenvatinibu rozpuštěného v ethanolu byly promyty 2 x 300 μ l ethanolu. Vzorky byly dále centrifugovány 2,5 min. při 7500 g pro odstranění precipitátu lenvatinibu. Supernatant byl nanesen na filtry Amicon[®] Ultra - 0.5 ml 3K (Merck Millipore, Billerica, MA, USA) a centrifugován při 15 000 g 5 min. Po první centrifugaci byl odebrán tzv. „první filtrát“. Následně byly vzorky promyty 2 x 300 μ l deionisované vody, přičemž při prvním promytí byl odebrán tzv. „druhý filtrát“ a při druhém promytí byl odebrán tzv. „třetí filtrát“. Poté byl odebrán roztok neprotékající použitým filtrem, lokalizovaný nad jeho povrchem, tzv. „frakce ApoLen“, ve které by měly být přítomny částice ApoLen. Z jednotlivých vzorků bylo odebráno 25 μ l a smícháno s 25 μ l acetonitrilu. Takto připravené vzorky byly analyzovány pro zjištění koncentrace lenvatinibu pomocí HPLC (Obr. 13). Koncentrace lenvatinibu byla stanovena pomocí vysokoúčinné kapalinové chromatografie (HPLC) s reversní fází. Podmínky při stanoveních shrnuje tab. 5.

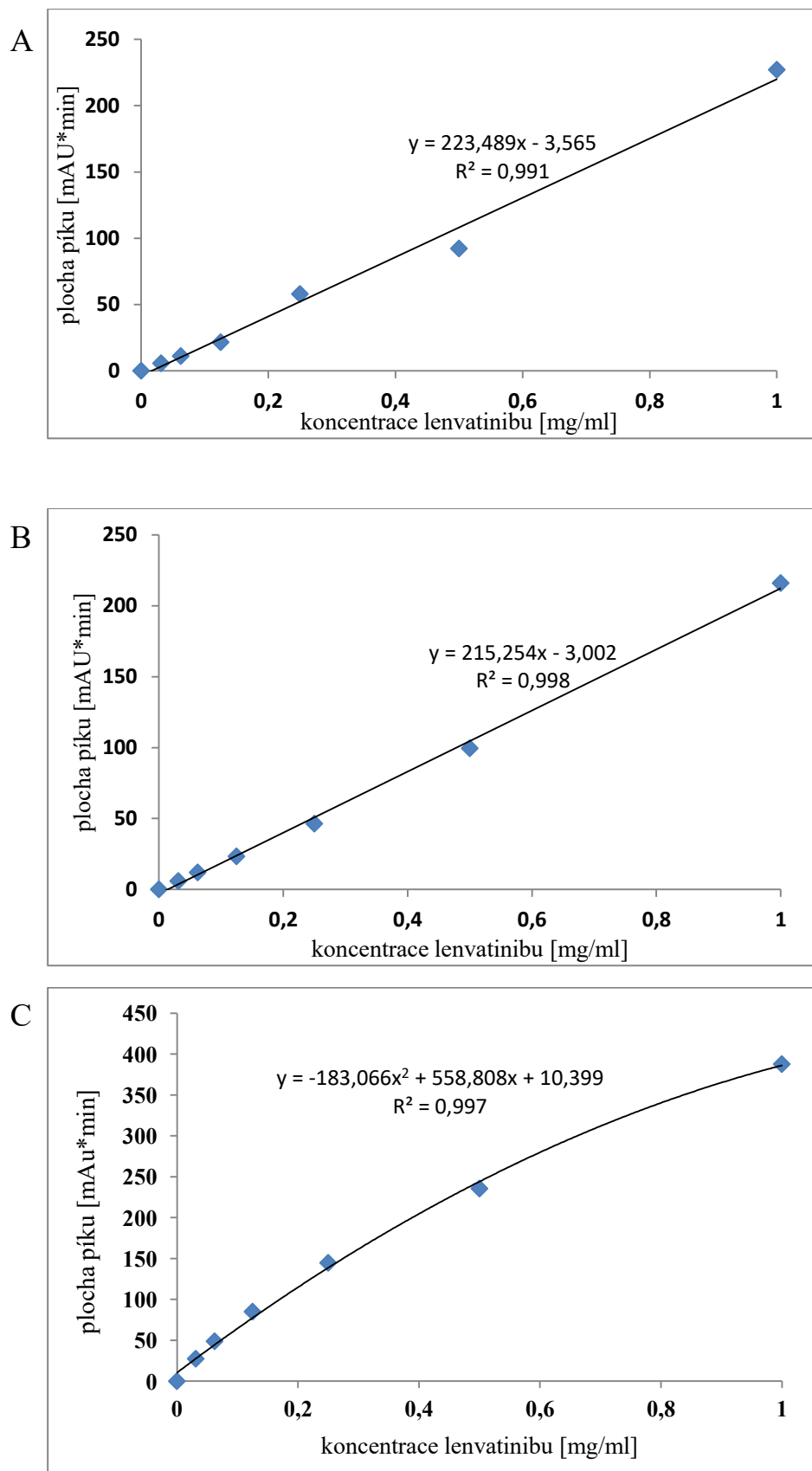


Obrázek 13: HPLC lenvatinibu.

Tabulka 5: Podmínky při stanovení lenvatinibu pomocí HPLC

Složení mobilní fáze	30% octan amonný (1,25 mM), 70% methanol
Kolona	<i>Nucleosil 100-5, C18, 150x4 mm, 5 μm (Macherey-Nagel)</i>
Teplota kolony	37 °C
Rychlost průtoku	0,6 ml/min
Objem nástřiku	10 μ l
Detekční vlnová délka - absorbance	254 nm
Doba eluce	5 min.

Ze získaných údajů relativních ploch píku jsme vypočítali koncentraci lenvatinibu ve vzorku dosazením do rovnic uvedených na Obr. 14 A, B a C. Z vypočítaných údajů byly sestrojeny sloupcové grafy uvedené ve výsledkové části práce (Obr. 23) pomocí programu *Microsoft Excel*.

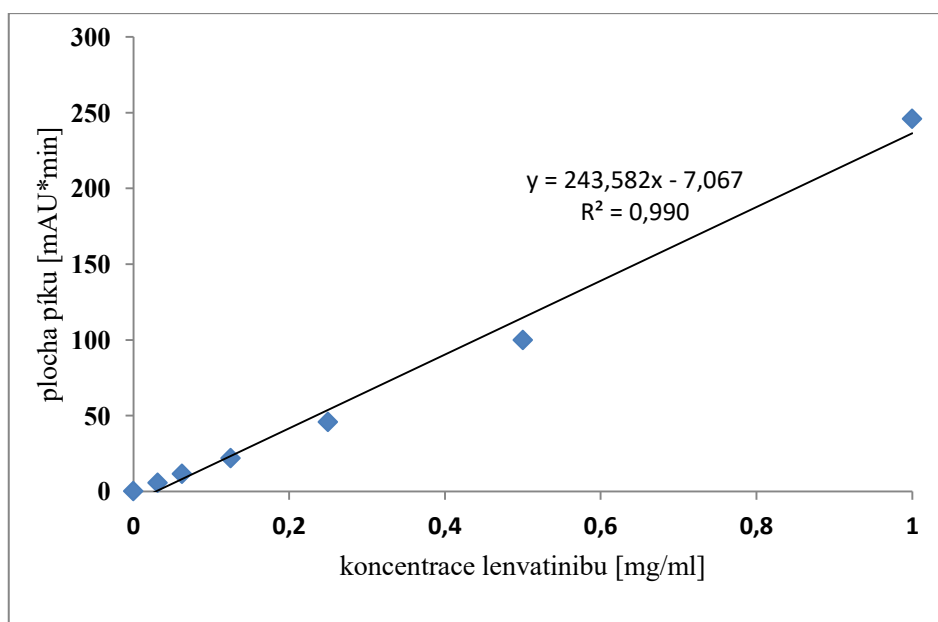


Obrázek 14: Kalibrační křivky pro stanovení koncentrace levatinibu rozpuštěného (A) v DMA, (B) v ethanolu, (C) v ethylenglykolu.

3.3.3 Příprava nanočástic lenvatinibu v liposomech

3.3.3.1 Příprava částic lenvatinibu v liposomech za použití roztoku lenvatinibu rozpuštěného v DMSO

Do skleněných zkumavek bylo pipetováno 50 μ l zásobního roztoku lipidů 1,2-didodekanoyl-sn-glycero-3-fosfocholinu (dále DLPC) rozpuštěných v chloroformu ($c=10$ mg/ml) a následně byl chloroform odstraněn ve vakuové odparce. Na stěnách zkumavky byl pak přítomen film DLPC (základ pro liposomy). K odparku bylo přidáno 10 μ l roztoku lenvatinibu rozpuštěného v DMSO o koncentracích 0,25 mg/ml a 0,5 mg/ml, 290 μ l deionisované vody a 1 μ l 1 M HCl. Vzorky byly poté sonikovány 5 min., promíchány za použití vortexu a opět sonikovány 5 min.. Vzorky pak byly přeneseny do zkumavek Eppendorf a dále centrifugovány 2,5 min. při 7500 g pro odstranění precipitátu lenvatinibu. Supernatant byl nanesen na filtry Amicon[®] Ultra - 0.5 ml 3K (Merck Millipore, Billerica, MA, USA) a centrifugován při 15 000 g, 5 min. Po první centrifugaci byl odebrán tzv. „první filtrát“. Následně byly vzorky promyty 2 x 300 μ l deionisované vody. Poté byl odebrán roztok neprotékající použitým filtrem, lokalisovaný nad jeho povrchem, tzv. „frakce ApoLen“, ve které by měly být přítomny částice ApoLen. Z jednotlivých vzorků bylo odebráno 25 μ l a smícháno s 25 μ l acetonitrilu. Takto připravené vzorky byly analyzovány na koncentraci lenvatinibu pomocí HPLC (Obr. 13) Koncentrace lenvatinibu byla stanovena pomocí vysokoúčinné kapalinové chromatografie (HPLC) s reversní fází. Podmínky při stanoveních shrnuje Tab. 5. Ze získaných údajů relativních ploch píku jsme vypočítali koncentraci lenvatinibu ve vzorku dosazením do rovnice uvedené na Obr. 15. Z vypočítaných údajů byly sestrojeny sloupcové grafy uvedené ve výsledkové části práce (Obr. 24) pomocí programu *Microsoft Excel*.



Obrázek 15: Kalibrační křivka pro stanovení lenvatinibu rozpuštěného v DMSO.

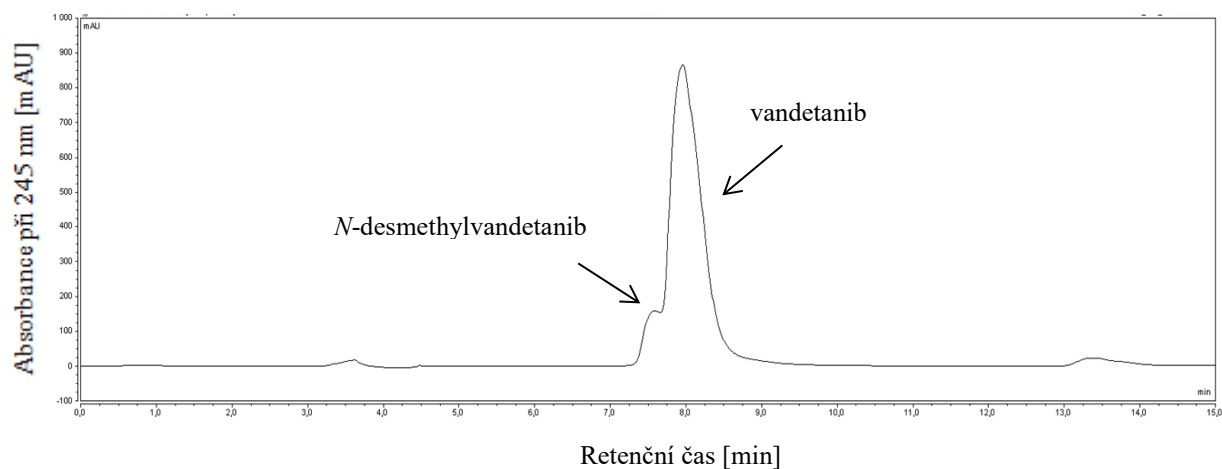
3.3.4 Kinetika oxidace vandetanibu lidskými rekombinantními cytochromy P450

Reakční směsi o celkovém objemu 250 μ l byly připraveny v dubletech a měly následující složení:

- 0,1 M fosfátový pufr (KH_2PO_4), pH = 7,4 (v objemu 197,5 μ l)
- roztoky vandetanibu v DMSO (v objemu 2,5 μ l) připraveny tak, aby výsledné koncentrace vandetanibu byly 2,5; 5; 10; 25; 50; 100; 200; 400 mM
- 200 nM CYP3A4 (v objemu 12,5 μ l); 100 nM CYP2D6, CYP1A1; CYP3A4 + cytochrom b_5 (v objemu 25 μ l)
- 1 mM NADPH (v objemu 25 μ l)

Jednotlivé složky směsi byly pipetovány v pořadí a objemech jak uvádí rozpis. Po přidání NADPH byly vzorky inkubovány 20 min. při teplotě 37 °C za stálého třepání při 450 RPM. Následně byla reakce zastavena přidáním 1 ml extrakčního činidla dichlormethanu a byl přidán vnitřní standard pro určení účinnosti extrakce [5 μ l fenacetinu rozpuštěného v methanolu ($c = 1$ mM)]. Vzorky jsme třepali 2 min. při 1400 RPM. Poté jsme vzorky centrifugovali 5 min na 15 000 g a byla odebrána organická fáze. Extrakce byla opakována se 750 μ l dichlormethanu. Organické fáze byly spojeny a odpařeny ve vakuové odparce. Odparky byly rozpuštěny v 50 μ l methanolu a analyzovány pomocí HPLC (Obr. 16). Koncentrace vandetanibu jakož i koncentrace jeho metabolitu *N*-

desmethylvandetanibu byly stanoveny pomocí vysokoúčinné kapalinové chromatografie (HPLC) s reversními fázemi. Podmínky při stanoveních shrnuje Tab. 6.



Obrázek 16: HPLC reakční směsi sledující oxidaci vandetanibu na *N*-desmethylvandetanib.

Tabulka 6: Podmínky HPLC při sledování oxidace vandetanibu

Složení mobilní fáze	54 % acetonitril
Kolona	<i>Nucleosil 100-5, C18, 250x4 mm, 5 μm (Macherey-Nagel)</i>
Teplota kolony	37 °C
Rychlost průtoku	0,6 ml/min
Objem nástřiku	10 μl
Detekční vlnová délka- absorbance	254 nm
Doba eluce	15 min.

Z analyzovaných údajů relativních ploch píků získaných při analýze byl sestrojen graf závislosti relativní plochy píku *N*-desmethylvandetanibu na koncentraci vandetanibu pomocí programu *Origin*. Relativní plochy píků *N*-desmethylvandetanibu byly vyhodnoceny s ohledem na účinnost extrakce jednotlivých vzorků, tedy na základě velikosti plochy píku vztažených na vnitřní standard fenacetin.

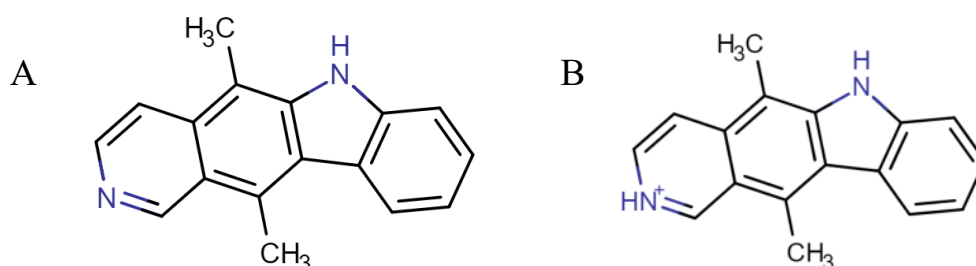
3.3.5 Molekulární „docking“ vandetanibu do Sloučeniny I lidských CYP1A1, 2D6 a 3A4

Struktura CYP1A1, 2D6 a 3A4 ve formě Sloučeniny I byla vytvořena na koordinátách PDB ID 418 V (CYP 1A1) (Walsh a kol., 2013), PDB ID 3TDA (CYP 2A6) (Wang a kol., 2015), PDB ID 1W0E (CYP 3A4) (Williams a kol., 2004) a PDB ID 6BD7 (CYP 3A4 s vázaným ligandem - ritonavir) (Samuels a Sevrioukova, 2018). Do enzymů byl „dockován“ vandetanib postupem popsáním v práci (Indra a kol., rukopis připravený k publikaci). Všechny výpočty a jejich interpretace byla prováděna doc. RNDr. Václavem Martínkem, PhD.

4. VÝSLEDKY

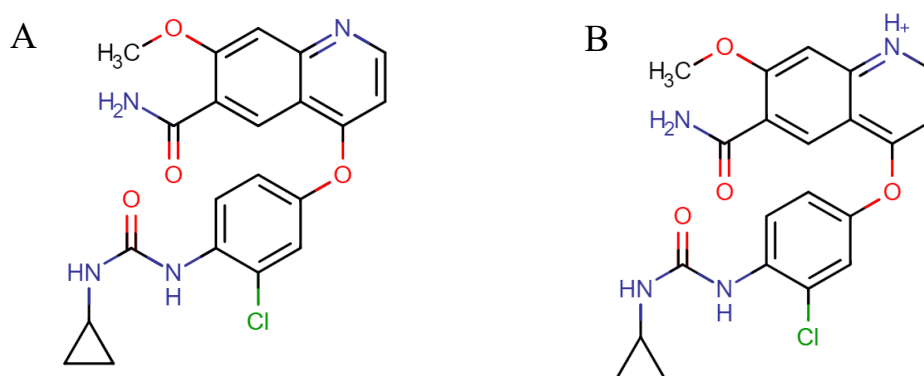
4.1 POČÍTAČOVÉ MODELOVÁNÍ ENKAPSULACE LÉČIV DO APOFERRITINU

V první části diplomové práce byly provedeny MD simulace enkapsulace dvou protinádorových léčiv (ellipticinu a lenvatinibu) do dutiny apoferritinu. Ellipticin se podařilo již v minulosti připravit ve formě nanotransportérů s vynikajícím výtěžkem enkapsulovaného ellipticinu ($c = 2,2 \text{ mM}$) (Indra R. a kol., 2019), byl proto použit jako model. Lenvatinib pak je hlavním objektem zájmu přípravy apoferritinových nanočástic v této diplomové práci. Některé jeho vlastnosti (pK_a) ho výrazně odlišují od ellipticinu. Zajímalo nás proto, jak se to projeví při interakci s apoferritinem. Experimentálně stanovená hodnota pK_a ellipticinu je 7,05 (Zsila, 2016). Při přípravě apoferritinových nanočástic se tedy molekuly ellipticinu nachází převážně v protonovaném kladně nabitěm stavu (Obr. 17 B).



Obrázek 17: Molekula ellipticinu v neutrální (A) a kladně nabitě formě (B). Převzato z (Calculation | pK_a . <https://chemicalize.com/#/calculation>).

Naproti tomu, teoretická hodnota pK_a lenvatinibu je pouze 5,4 (vypočteno pomocí programu ChemAxon - Calculation | pK_a . <https://chemicalize.com/#/calculation>). Při přípravě apoferritinových nanočástic se tedy molekuly lenvatinibu nacházejí nejprve v protonovaném kladně nabitěm stavu (Obr. 18 A). Nicméně při následném zvyšování hodnot pH, kdy v procesu enkapsulace léčiva dochází ke klíčové asociaci podjednotek apoferritinu, přechází lenvatinib do neutrálního stavu (Obr. 18 B).



Obrázek 18: Molekula lenvatinibu v neutrální (A) a kladně nabitě formě (B). Převzato z (Calculation | pKa. <https://chemicalize.com/#/calculation>).

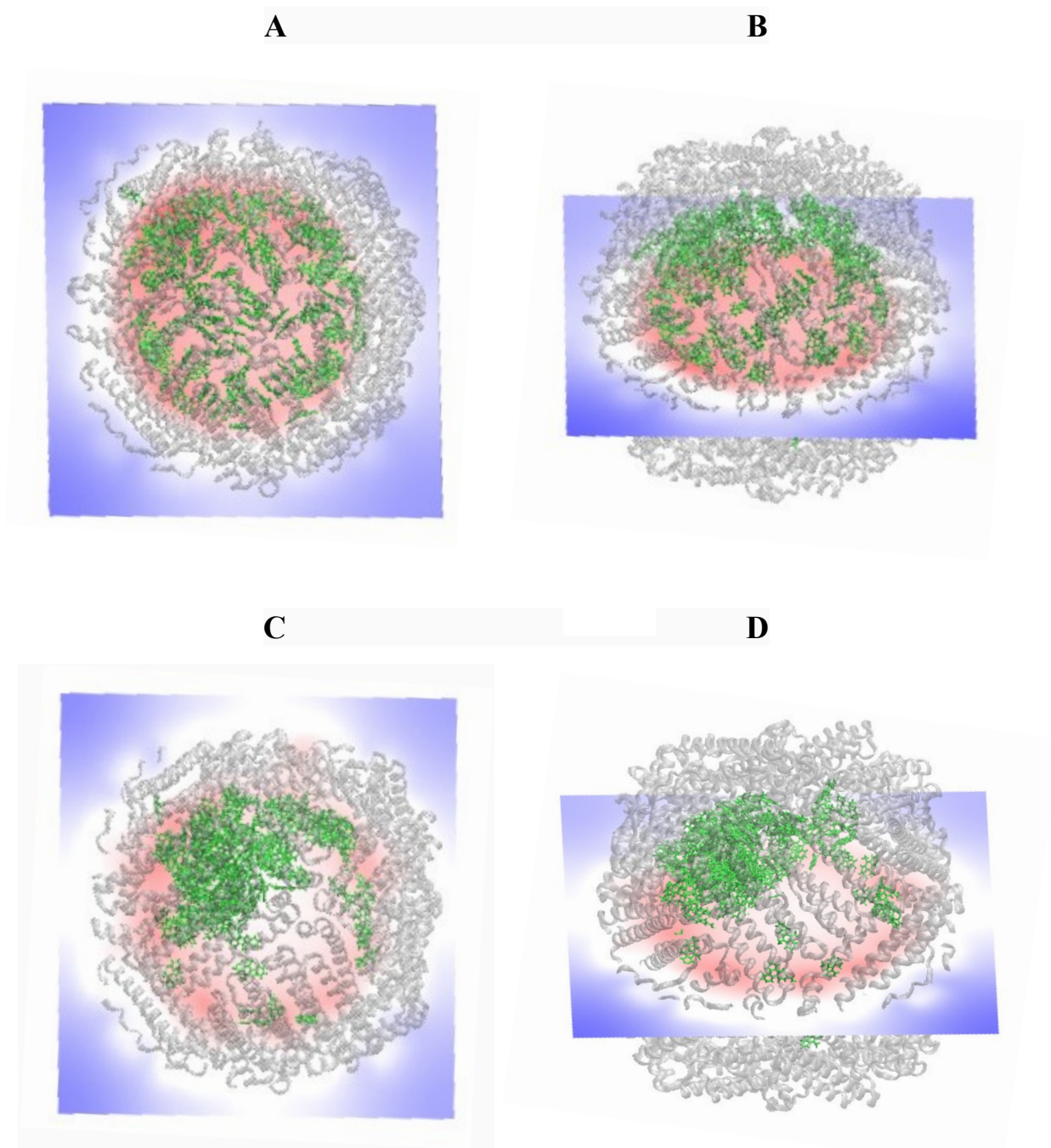
4.1.1 Distribuce elliptycinu uvnitř dutiny apoferritinu

Elektrostatický potenciál je vně molekuly apoferritinu kladný (na Obr. 19 modrá barva), kdežto ve vnitřní dutině apoferritinu je záporný (na Obr. 19 červená barva). Tomu odpovídají markantně odlišné výsledné distribuce protonovaných vs. neutrálních molekul elliptycinu (na Obr. 19 zobrazených zelenou barvou), pozorované v našich MD simulacích.

Kladně nabitě molekuly protonovaného elliptycinu byly přitahovány záporně nabitými aminokyselinami apoferritinu a na konci MD simulace byly optimálně rozprostřeny po povrchu jeho dutiny (Obr. 19 A a B).

Nenabitě molekuly neutrálního elliptycinu se chovají výrazně odlišně. Dochází k jejich precipitaci uvnitř dutiny apoferritinu (Obr. 19 C a D).

Experimentálně stanovená hodnota pKa elliptycinu je 7,05. Předpokládáme proto, že při enkapsulaci elliptycinu do dutiny apoferritinu v rámci přípravy nanočástic bylo léčivo v kladně nabitě protonované formě. To bylo optimální z hlediska jeho interakce s vnitřním povrchem dutiny apoferritinu a nepochybně to přispělo k vysokému výtěžku při tvorbě nanotransportérů (Indra a kol., 2019).



Obrázek 19: Distribuce molekul ellipticinu uvnitř dutiny apoferritinu na konci MD simulací. Struktura apoferritinu je zobrazena šedou barvou. Elektrostatický potenciál, kterým apoferritin působí na své okolí je v oblasti kladných hodnot modrý a v oblasti záporných hodnot červený. Molekuly ellipticinu jsou zobrazené zelenou barvou. A: Kladně nabitě molekuly ellipticinu rozprostřené po povrchu dutiny (pohled shora). B: Kladně nabitě molekuly ellipticinu rozprostřené po povrchu dutiny (pohled z boku). C: Neutrální molekuly ellipticinu precipitují uvnitř dutiny (pohled shora). D: Neutrální molekuly ellipticinu precipitují uvnitř dutiny (pohled z boku).

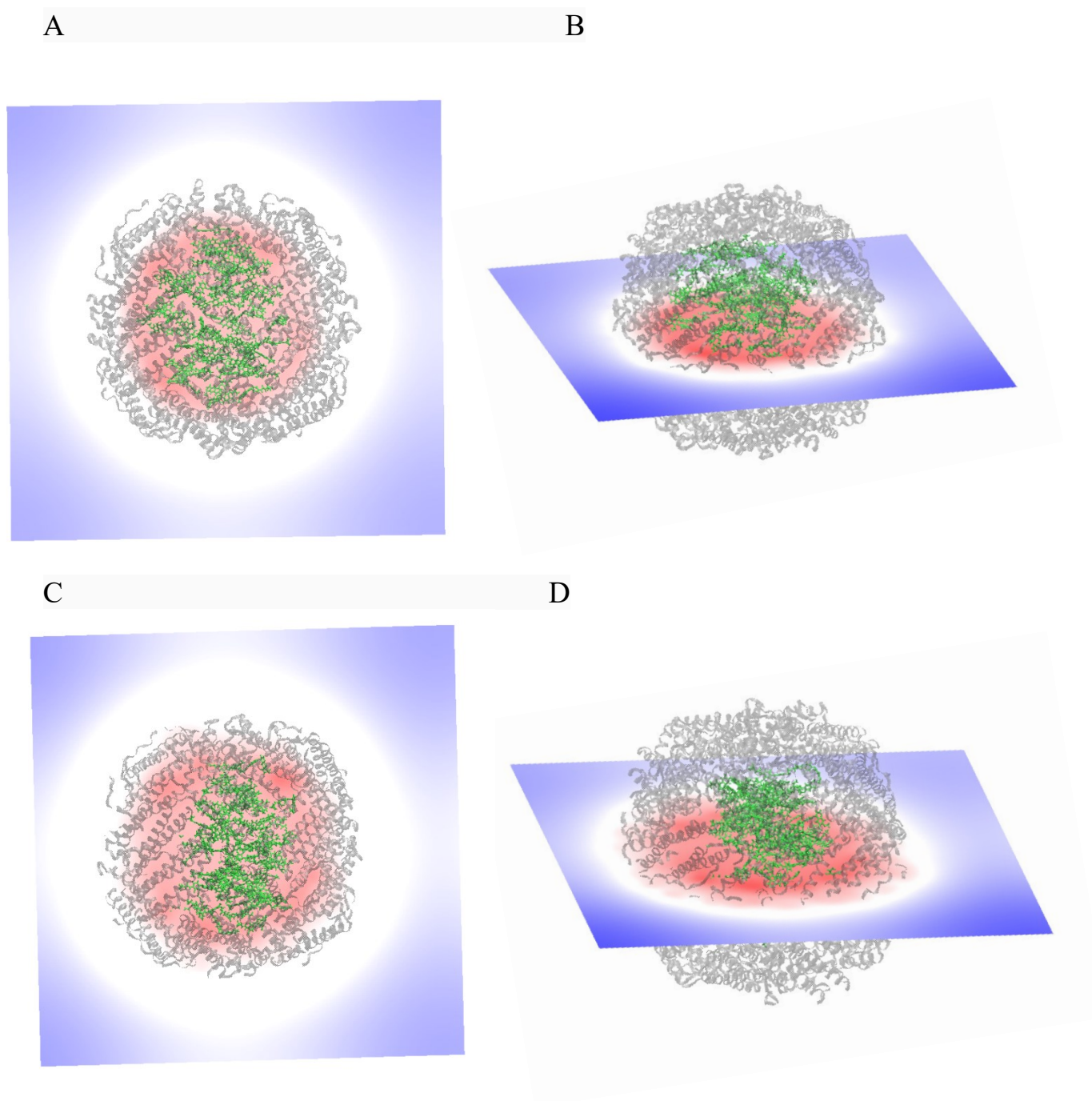
4.1.2 Distribuce lenvatinibu uvnitř dutiny apoferritinu

Jak již bylo uvedeno výše je elektrostatický potenciál vně molekuly apoferritinu kladný (na Obr. 20 modrá barva), kdežto ve vnitřní dutině je záporný (na Obr. 20 červená barva). Tomu odpovídají markantně odlišné výsledné distribuce protonovaných vs. neutrálních molekul lenvatinibu (na Obr. 20 zobrazených zelenou barvou) pozorované v našich MD simulacích.

Kladně nabitě molekuly protonovaného lenvatinibu byly přitahovány záporně nabitými aminokyselinami apoferritinu a na konci MD simulace byly optimálně rozprostřeny po povrchu jeho dutiny (Obr. 20 A a B).

Nenabitě molekuly neutrálního lenvatinibu se chovají výrazně odlišně. Dochází k jejich precipitaci uvnitř dutiny apoferritinu (Obr. 20 C a D).

Teoretická hodnota pK_a lenvatinibu je 5,1. Předpokládáme proto, že při enkapsulaci lenvatinibu do dutiny apoferritinu v rámci přípravy nanočástic bylo léčivo v neutrální neprotonované formě. To nepochybně přispělo k chabému výtěžku při tvorbě nanotransportérů.



Obrázek 20: Distribuce molekul lenvatinibu uvnitř dutiny apoferritinu na konci MD simulací. Struktura apoferritinu je zobrazena šedou barvou. Elektrostatický potenciál, kterým apoferritin působí na své okolí je v oblasti kladných hodnot modrý a v oblasti záporných hodnot červený. Molekuly lenvatinibu jsou zobrazené zelenou barvou. A: Kladně nabitě molekuly lenvatinibu rozprostřené po povrchu dutiny (pohled shora). B: Kladně nabitě molekuly lenvatinibu rozprostřené po povrchu dutiny (pohled z boku). C: Neutrální molekuly lenvatinibu precipitují uvnitř dutiny (pohled shora). D: Neutrální molekuly lenvatinibu precipitují uvnitř dutiny (pohled z boku).

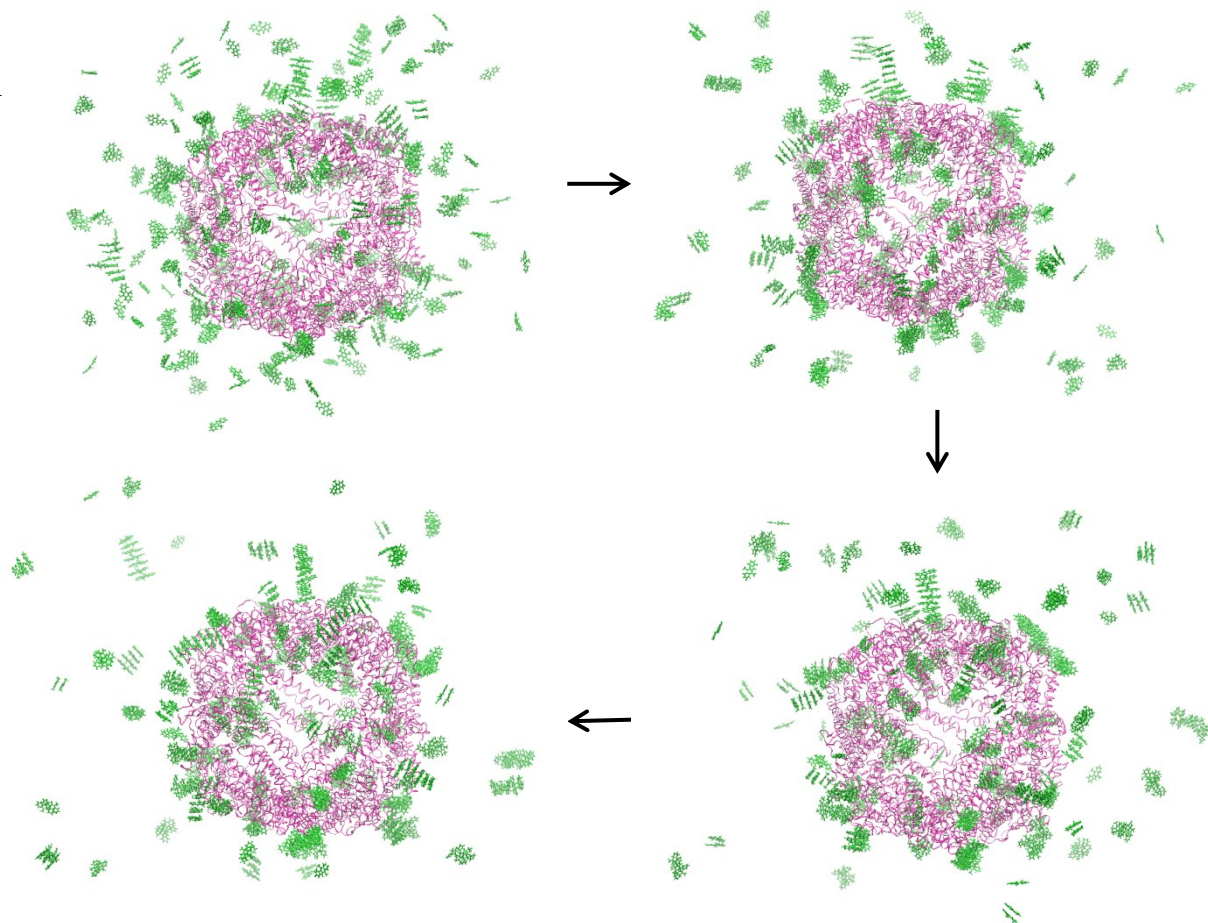
4.1.3 Enkapsulace molekul ellipticinu do dutiny apoferritinu

Pro detailní objasnění mechanismu enkapsulace ellipticinu do dutiny apoferritinu při přípravě částic ApoElli jsme vytvořili model tzv. „děravé“ struktury apoferritinu, kde byla vynechána jedna, z celkem 24, jeho podjednotek. To odpovídá terminální fázi asociace podjednotek apoferritinu, kdy jsou molekuly ellipticinu protonované, mají kladný náboj.

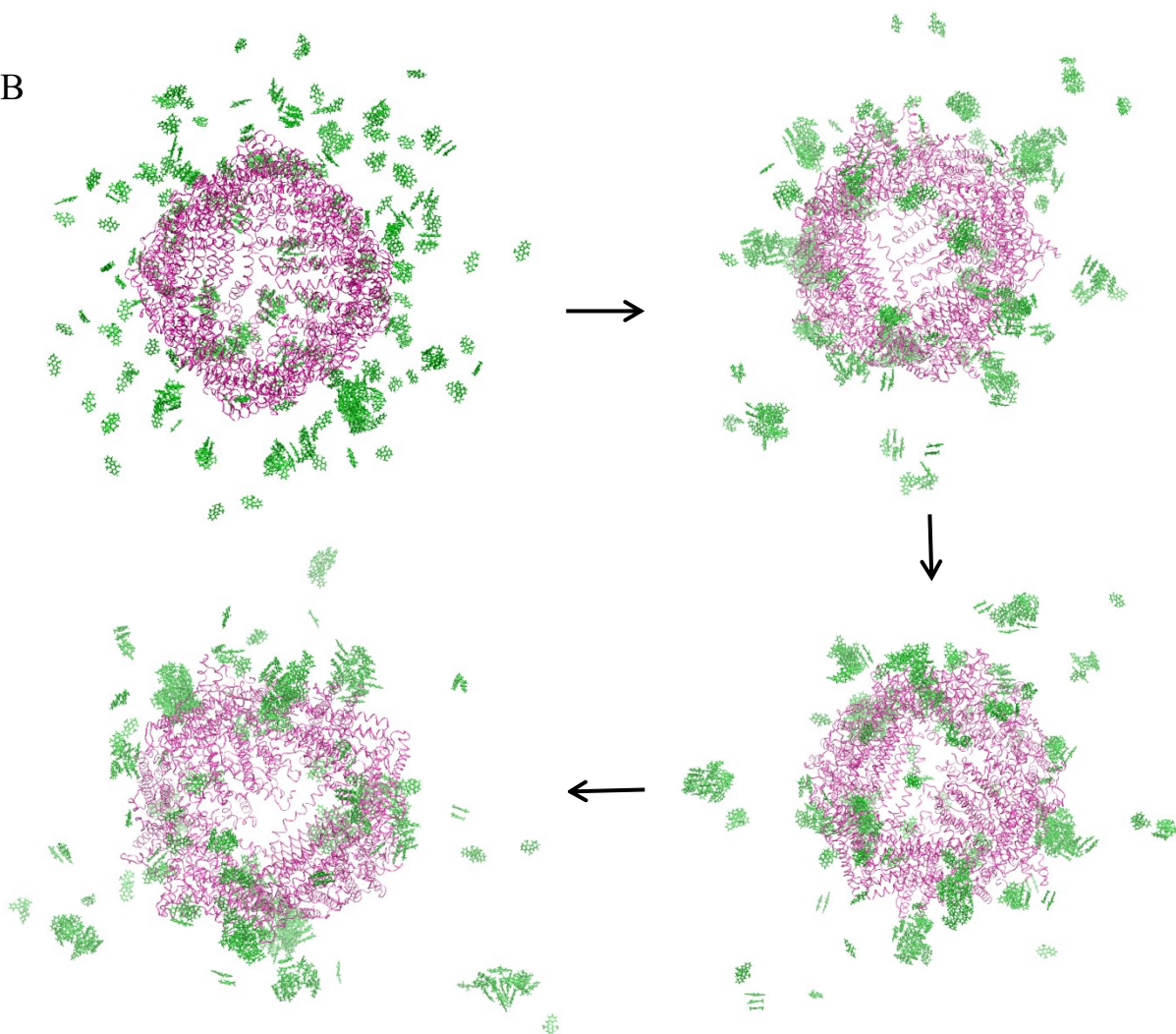
Z Obr. 21 A je patrné, že v případě kladně nabitých molekul ellipticinu (znázorněné zelenou barvou) dochází k jejich úspěšné enkapsulaci do dutiny apoferritinu. Interagují se záporně nabitým povrchem jeho dutiny. Molekuly ellipticinu přitom mají tendenci vytvářet relativně dlouhé sloupce stabilisované prostřednictvím tzv. „stackingu“. Tj. chovají se podobně jako např. báze nukleových kyselin. Kromě námi záměrně vytvořeného otvoru ve struktuře apoferritinu, kdy jsme odebrali jednu z jeho podjednotek, došlo v průběhu dlouhé MD simulace k výraznému rozšíření otvorů v místě, kde se jednotlivé monomery apoferritinu stýkají. Tyto otvory nejsou v krystalové struktuře zřetelné vzhledem k přítomnosti kladně nabitých bivalentních iontů. Bez jejich přítomnosti a v důsledku vysoké koncentrace záporně nabitých aminokyselin na rozhraní podjednotek apoferritinu došlo ke strukturním změnám tak výrazným, že samy o sobě umožňují průchod protonovaných molekul ellipticinu tvořících lineární řetězce.

Na Obr. 21 B naopak vidíme, že neutrální molekuly neprotonovaného ellipticinu (opět znázorněné zelenou barvou) nevstupují do dutiny apoferritinu a nedochází tudíž k jejich enkapsulaci. Molekuly neprotonovaného ellipticinu mají tendenci agregovat. Tyto relativně rozměrné klastry nemohou pronikat prostřednictvím spontánně se tvořící otvory na pomezí podjednotek apoferritinu, ale dokonce ani prostřednictvím záměrně vytvořeného otvoru vzniklého cíleným odebráním jedné z podjednotek apoferritinu. Jak bylo uvedeno výše, vzhledem k pKa ellipticinu nepředpokládáme, že by se v našich experimentech vyskytoval v neprotonované formě. MD simulace s neprotonovaným ellipticinem tedy slouží spíše k ilustraci chování léčiv s výrazně nižším pKa, u nichž evidentně zabudování do nanotransortérů na bázi apoferritinu nemusí být úspěšná.

A



B



Obrázek 21: Distribuce molekul ellipticinu uvnitř dutiny apoferritinu na konci MD simulací. Struktura apoferritinu je zobrazena fialovou barvou. Molekuly ellipticinu jsou zobrazeny zelenou barvou. A: Enkapsulace kladně nabitých molekul ellipticinu do tzv. „děravé“ struktury apoferritinu rozprostřené po povrchu dutiny. Na obrázcích jsou uvedeny 1., 6., 15. a finální snímek simulace ve vzestupném pořadí. B: Enkapsulace neutrálních molekul ellipticinu do „děravé“ struktury apoferritinu rozprostřené po povrchu dutiny. Na obrázcích jsou uvedeny 1., 12., 21. a finální snímek simulace ve vzestupném pořadí.

4.1.4 Enkapsulace molekul lenvatinibu do dutiny apoferritinu

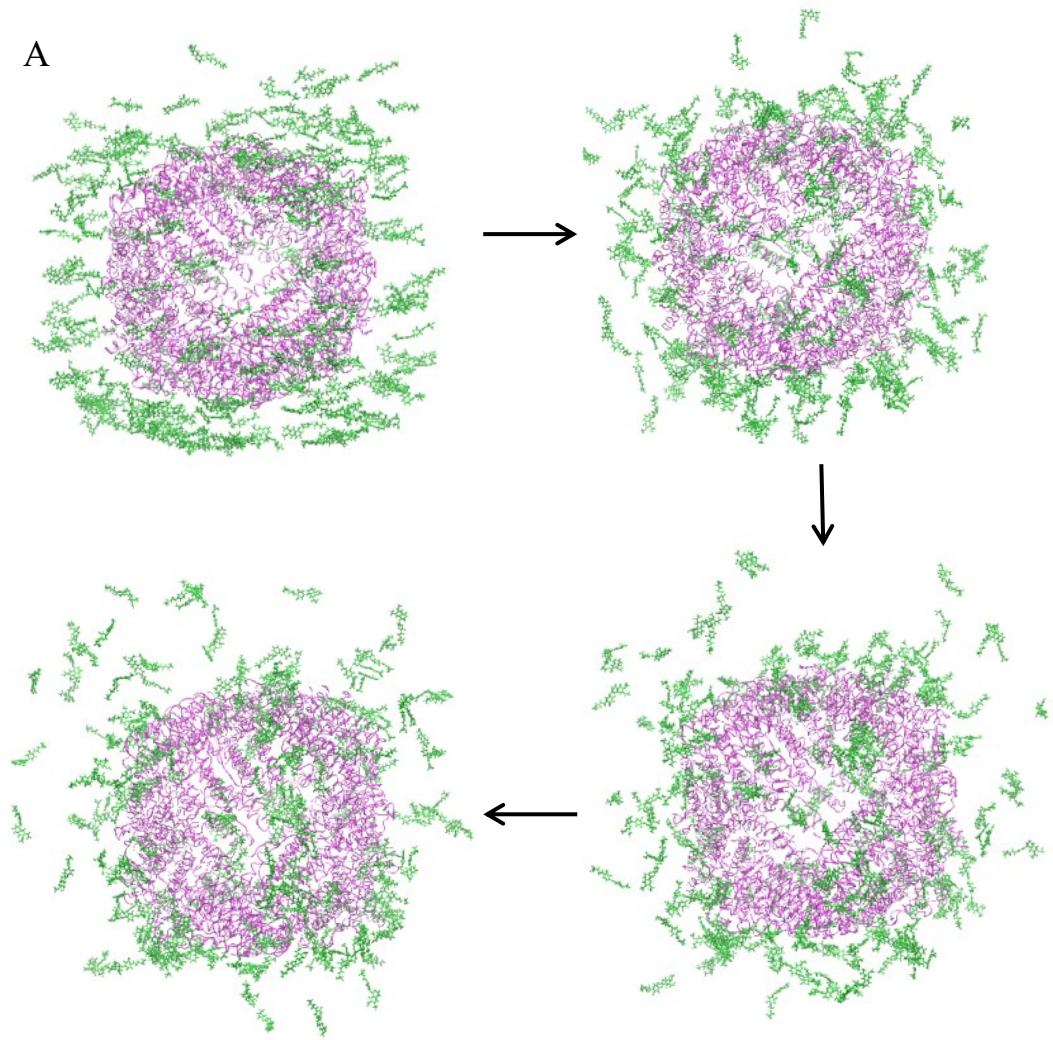
Pro objasnění mechanismu tvorby částic ApoLen jsme provedli MD simulace enkapsulace molekul lenvatinibu do dutiny apoferritinu. Opět jsme využili tzv. „děravé“ struktury apoferritinu, kde byla vynechána jedna z jeho 24 podjednotek.

Z Obr. 22 A je patrné, že dochází k enkapsulaci jednotlivých kladně nabitých molekul lenvatinibu (znázorněných zelenou barvou) do záporně nabitě dutiny apoferritinu (znázorněného růžovou barvou). Tento proces je však výrazně pomalejší než v případě referenčních molekul ellipticinu, které vytvářely jednodimenziální klastry s relativně vysokým celkovým nábojem. Na Obr. 22 B naopak vidíme, že neutrální molekuly lenvatinibu nejsou do záporně nabitě dutiny apoferritinu vtahovány. Navíc postupně agregují do shluků, které by při delší MD simulaci mohly narůst do rozměrů bránících enkapsulaci. Jak bylo uvedeno výše, při přípravě částic ApoLen jsou molekuly lenvatinibu převážně neutrální. Výše uvedené výsledky MD simulací tedy názorně ukazují, proč příprava ApoLen částic nebyla příliš úspěšná.

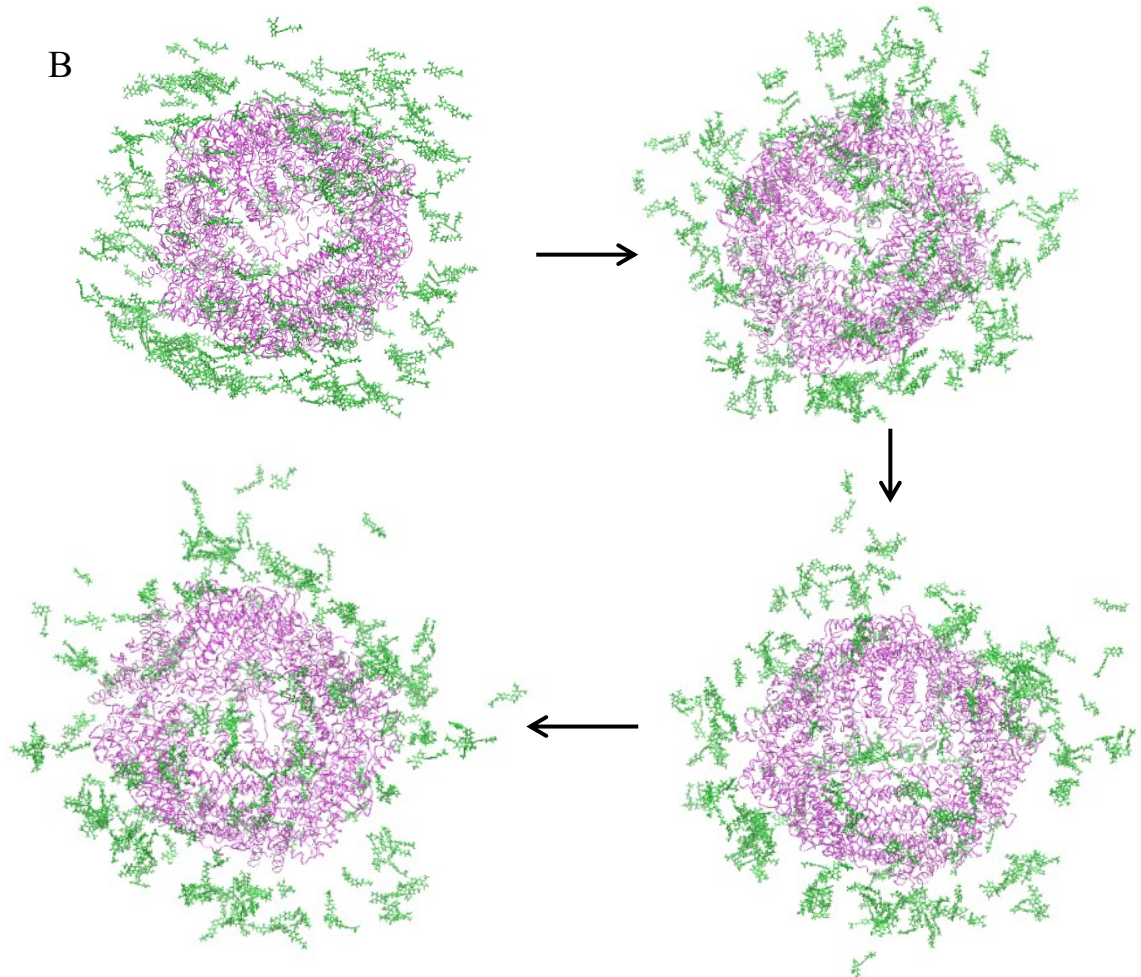
Z uvedených výsledků vyplývá, že protinádorové léčivo ellipticin je vhodné pro přípravu nanotransporterových částic ApoElli, jelikož interaguje se záporně nabitým povrchem dutiny apoferritinu a dochází k jeho efektivní enkapsulaci. Získané výsledky přispívají k teoretickému vysvětlení úspěšné experimentální přípravy částic ApoElli v naší laboratoři (Indra R. a kol., 2019). Je naopak zřejmé, proč protinádorové léčivo lenvatinib není, v důsledku nízké hodnoty pKa, vhodné pro přípravu částic ApoLen. Většina molekul lenvatinibu je při přípravě částic ApoLen neprotonovaná, vytváří relativně velké shluky a nedochází tak k jejich enkapsulaci.

Naše výsledky dokládají, že metodika MD simulací by mohla být v budoucnu využita pro předběžný virtuální „screening“ a vytipování látek, pro něž má smysl provádět experimenty.

A



B



Obrázek 22: Distribuce molekul lenvatinibu uvnitř dutiny apoferritinu na konci MD simulací. Struktura apoferritinu je zobrazena fialovou barvou. Molekuly lenvatinibu jsou zobrazeny zelenou barvou. A: Enkapsulace kladně nabitých molekul lenvatinibu do tzv. „děravé“ struktury apoferritinu rozprostřené po povrchu dutiny. Na obrázcích jsou uvedeny 1., 4., 7., a finální snímek simulace ve vzestupném pořadí. B: Enkapsulace neutrálních molekul lenvatinibu do „děravé“ struktury apoferritinu rozprostřené po povrchu dutiny. Na obrázcích jsou uvedeny 1., 3., 6. a finální snímek simulace ve vzestupném pořadí.

4.2 PŘÍPRAVA ČÁSTIC LENVATINIBU V APOFERRITINU

I když výše uvedené teoretické studie signalisují, že lenvatinib nebude vhodným léčivem pro k enkapsulaci do apoferritinu, přesto jsme se v další části diplomové práce pokusili ověřit tento předpoklad experimentálně, tedy o experimentální přípravu lenvatinibu v apoferritinu.

4.2.1 Výběr rozpouštědla pro přípravu částic lenvatinibu v apoferritinu

Vzhledem k nízké rozpustnosti lenvatinibu ve vodě jsme se nejdříve zabývali hledáním vhodného rozpouštědla pro přípravu jeho roztoku. Jako rozpouštědla, ve kterých se lenvatinib rozpouští a zároveň nedenaturuje apoferritin byly nalezeny ethanol, methanol, DMA, ethylenglykol a DMSO v kyselém prostředí. I když byl methanol shledán jako vhodné rozpouštědlo lenvatinibu, ve většině experimentů nebyl použit vzhledem k tomu, že je daleko toxičtější než ethanol.

4.2.2 Příprava částic lenvatinibu v apoferritinu za použití roztoku lenvatinibu rozpuštěného v ethylenglykolu, *N,N*-dimethyacetamidu a ethanolu

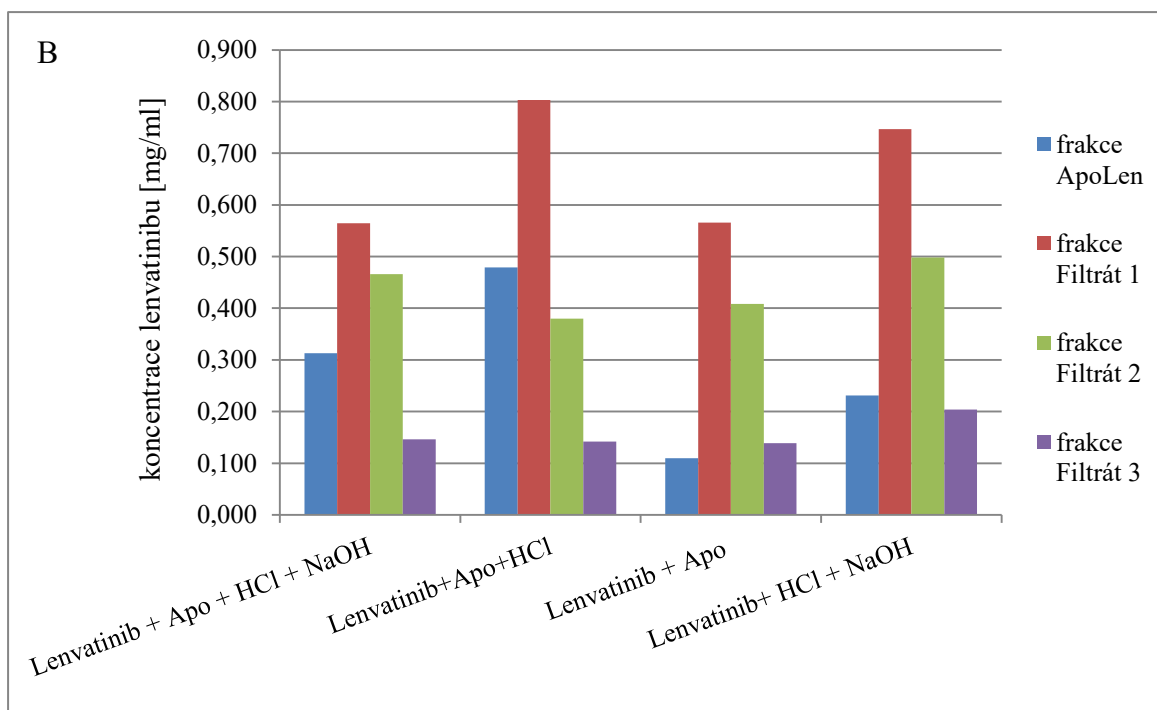
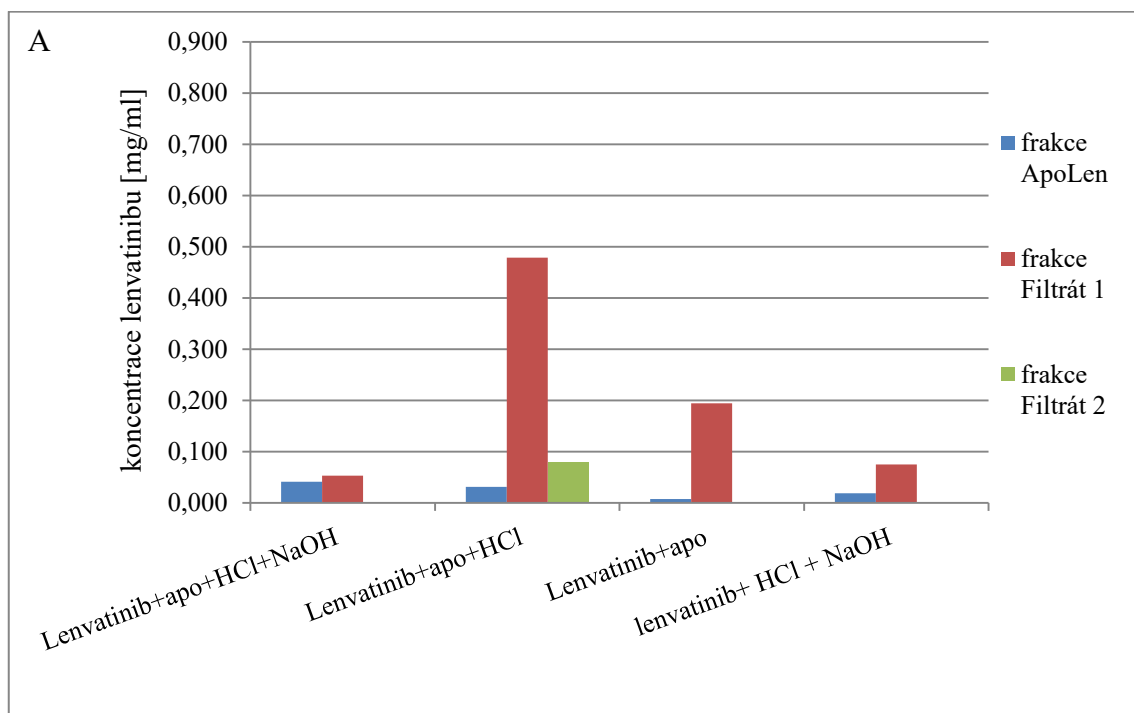
Lenvatinib je sice nejlépe rozpustný v DMSO, ale pouze v kyselém prostředí (tab. 4). V další fázi experimentů nezbytných pro přípravu částic ApoLen nebyl proto jeho roztok v DMSO použit, vzhledem k tomu, že při proceduře se při finálním kroku používá změna pH z kyselého na alkalické a za těchto podmínek dochází za použití roztoku DMSO v bazickém prostředí k precipitaci lenvatinibu. Pro přípravu částic ApoLen jsme proto jako rozpouštědla použili ethylenglykol, ethanol a *N,N*-dimethylacetamid (DMA) v poměru 1:2 s vodou nebo ethanolem. Při tomto poměru rozpouštědel nedocházelo k denuraci

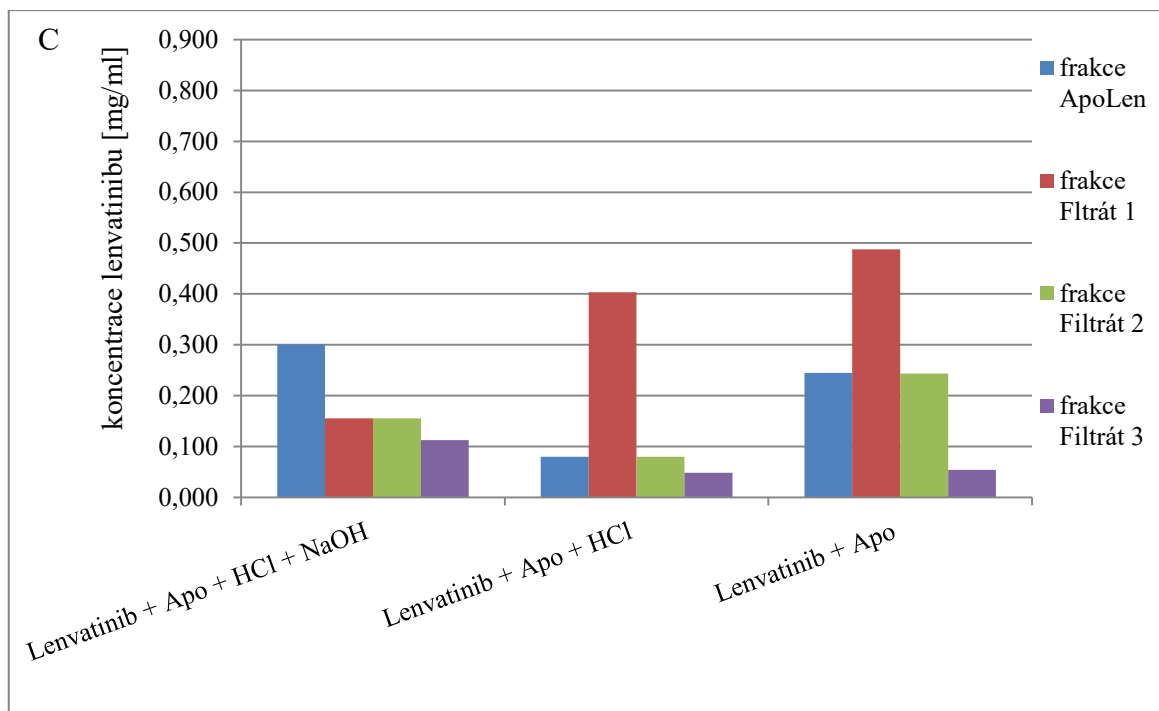
apoferritinu a zároveň se zachovala rozpustnost lenvatinibu. Obr. 23 A, B a C přináší výsledky ze studia přípravy nanočástic za použití výše uvedených rozpouštědel.

Ve vzorcích, které obsahovaly všechny složky potřebné pro přípravu částic ApoLen, tedy lenvatinib, apoferritin, HCl a NaOH byla u všech vzorků zjištěna nízká hodnota koncentrace lenvatinibu ve frakci, ve které by částice ApoLen měly být přítomny (tzv. „frakce ApoLen“). Nejnižší koncentrace lenvatinibu ve „frakci ApoLen“ byly nalezeny u vzorků připravených za použití lenvatinibu rozpuštěného v ethylenglykolu. Naopak většina lenvatinibu zůstala v rozpustné frakci inkubační směsi, která protéká filtrem (tzv. „frakce Filtrát 1, 2 a 3“). Ve vzorcích negativní kontroly, kde nedocházelo k zavírání apoferritinu (do vzorků nebyl přidán NaOH) byla překvapivě zjištěna přítomnost lenvatinibu ve frakci odpovídající lokalizaci „frakci ApoLen“, kde však částice ApoLen nemohly být přítomny. V případě přípravy částic ApoLen ze zásobního roztoku lenvatinibu rozpuštěného v DMA byla v negativní kontrole koncentrace lenvatinibu ve frakci lokalizované na filtru, tedy ve frakci, kde by měly být přítomny částice ApoLen vyšší, než v případě vzorků s obsahem všech potřebných složek. Většina lenvatinibu také zůstala v rozpustné frakci protékající filtrem, přičemž koncentrace lenvatinibu v této frakci byly ještě vyšší než v případě vzorků se všemi potřebnými složkami. Ve vzorcích negativní kontroly, které neobsahovaly ani HCl ani NaOH byla ve všech vzorcích opět zjištěna koncentrace lenvatinibu ve frakci nad filtrem, kde by měly být přítomny částice ApoLen. V případě vzorků za použití roztoku lenvatinibu rozpuštěného v ethylenglykolu a DMA byla koncentrace lenvatinibu v této frakci nejnižší. V případě použití roztoku lenvatinibu rozpuštěného v ethanolu byla koncentrace lenvatinibu nižší než v případě použití všech složek reakční směsi, ale vyšší než v případě vzorků bez přidání HCl. Hodnoty koncentrace lenvatinibu ve frakcích protékajících filtrem byly opět vyšší, než v případě vzorků se všemi potřebnými složkami.

Na základě uvedených výsledků lze předpokládat, že frakce, která je zadržovaná na filtru (lokalizovaná nad filtrem), tzv. „frakce ApoLen“ neobsahovala nanočástice ApoLen, nýbrž pravděpodobně precipitovaný lenvatinib. Ze získaných výsledků tedy vyplývá, že za podmínek užitých v experimentech pro tvorbu částic ApoLen (částice s enkapsulovaným lenvatinibem) k jejich tvorbě nedochází. V dalších experimentech, kde bylo testováno, zda použité podmínky byly pro enkapsulaci lenvatinibu vhodné, byly zjištěny analogické výsledky. Ke tvorbě částic ApoLen nedochází ani za použití řady kombinací různých koncentrací jednotlivých složek inkubačních směsí, ani vlivu rozličných hodnot pH, které

ovlivňují disociaci a asociaci apoferritinových podjednotek. Proto zmíněné výsledky nejsou v práci uvedeny. Získané výsledky sice nepřinesly pozitivní data z hlediska přípravy částic ApoLen, potvrdily ale výsledky z teoretických studií (počítačového modelování). Uvedené teoretické studie mohou být tedy využity pro „screening“ přípravy apoferritinových částic s dalšími léčivy, a to ještě před experimenty





Obrázek 23: Koncentrace lenvatinibu ve frakcích vzorků použitých pro přípravu částic ApoLen z roztoku lenvatinibu rozpuštěného v ethylenglykolu (A), DMA (B) a ethanolu (C). Frakce „ApoLen“ - frakce zadržována na použitém filtru. „Frakce Filtrát 1“ - frakce vzorku protékající filtrem po první centrifugaci. „Frakce Filtrát 2“ - frakce vzorku protékající filtrem po prvním promytí. „Frakce Filtrát 3“ - frakce vzorku protékající filtrem po druhém promytí. V obrázku jsou uvedeny hodnoty průměrů ze dvou experimentů. Vzorky použité v experimentech a uvedené v obrázcích obsahovaly: Lenvatinib + apo + HCl + NaOH: do reakční směsi byly přidány všechny složky, tudíž by mělo docházet k enkapsulaci lenvatinibu do apoferritinu. Lenvatinib+ apo+HCl: do reakční směsi nebylo přidáno NaOH, tudíž nedošlo k neutralizaci a uzavření apoferritinu. Lenvatinib + apo: do reakční směsi nebylo přidáno HCl ani NaOH, tudíž nedošlo ani k otevření ani uzavření apoferritinu.

4.3 PŘÍPRAVA ČÁSTIC LENVATINIBU V LIPOSOMECH

Jelikož příprava lenvatinibu ve formě částic ApoLen nebyla úspěšná, pokusili jsme se připravit lenvatinib v jiných částicích, konkrétně v liposomech. Pro tyto účely jsme pro tvorbu liposomů použili 1,2 - didodekanoyl-sn-glycero-3-fosfocholin (dále jako DLPC-sn). Pro rozpuštění lenvatinibu v reakční směsi jsme využili jako rozpouštědlo DMSO, které účinně rozpouští lenvatinib a zároveň je mísitelné s vodou v kyselém prostředí. V tomto případě, na rozdíl od experimentů s apoferritinem, byl roztok vhodný pro další experimenty. Přidáním liposomů k tomuto roztoku nedocházelo ke změnám v rozpustnosti lenvatinibu.

4.3.1 Příprava částic lenvatinibu v liposomech za použití roztoku lenvatinibu rozpuštěného v DMSO

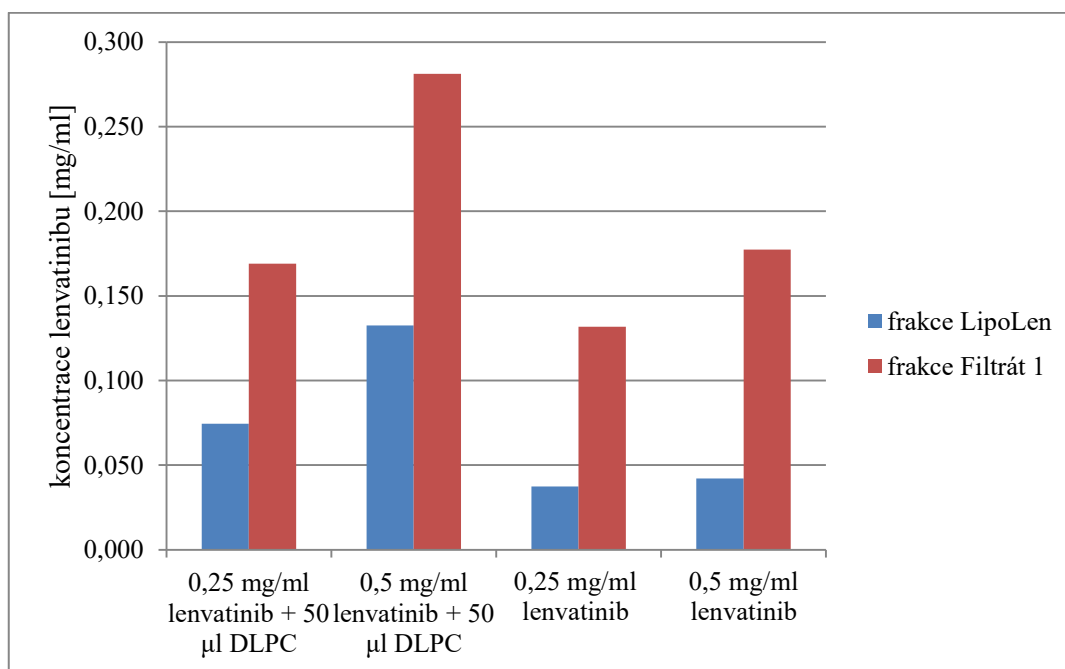
Pro přípravu částic lenvatinibu v liposomech (částic LipoLen) byl použit roztok lenvatinibu rozpuštěného v DMSO v poměru s vodou 1:29. Obr. 24 přináší výsledky ze studia přípravy nanočástic LipoLen za použití dvou různých koncentrací lenvatinibu rozpuštěného v DMSO. Jako negativní kontroly experimentu jsme připravili vzorky, které neobsahovaly liposomy (DLPC).

Ve vzorcích, které obsahovaly všechny potřebné složky nutné pro přípravu částic LipoLen, tedy rozpuštěný lenvatinib a DLPC ve formě liposomů (vzorky „0,5 mg/ml lenvatinibu + DLPC“ a „0,25 mg/ml lenvatinibu + DLPC“) byla zjištěna přítomnost lenvatinibu ve frakci, ve které by měly být přítomny částice LipoLen (dále „frakce LipoLen“). Vyšší koncentrace lenvatinibu ve „frakci LipoLen“ byla nalezena v případě vzorků za použití vyšší koncentrace lenvatinibu $c = 0,5 \text{ mg/ml}$ (vzorky „0,5 mg/ml lenvatinibu + DLPC“). Většina lenvatinibu však zůstala v rozpustné frakci inkubační směsi, která protéká filtrem (dále „frakce Filtrát“). Enkapsulace lenvatinibu do liposomů byla málo efektivní.

Ve vzorcích negativní kontroly (vzorky „0,5 mg/ml lenvatinib“ a „0,25 mg/ml lenvatinib“), kde nebyly přítomny liposomy byla rovněž zjištěna nízká koncentrace lenvatinibu ve „frakci LipoLen“, kde jsou jinak přítomny částice LipoLen. Tato koncentrace však byla mnohem nižší než v případě koncentrace lenvatinibu ve „frakci LipoLen“ ve vzorcích obsahujících všechny složky potřebné pro tvorbu částic LipoLen. Většina lenvatinibu byla ale nalezena v rozpustné frakci protékající filtrem.

Na základě uvedených výsledků je zřejmé, že „frakce LipoLen“, která je zadržovaná na filtru obsahovala částice LipoLen. Nicméně nemůžeme vyloučit, že v této frakci mohou být přítomny i molekuly lenvatinibu ve formě precipitátu - viz vzorky negativní kontroly. Ze získaných výsledků vyplývá, že za podmínek užitých v experimentech pro tvorbu částic LipoLen (částice s enkapsulovaným lenvatinibem) ke tvorbě těchto částic dochází, ale jenom ve velmi nízkých koncentracích. Nejsou tedy vhodné pro další využití konkrétně v protinádorové léčbě. V dalších experimentech, kde bylo testováno, zda použité podmínky jsou pro enkapsulaci vhodné, byly zjištěny analogické výsledky. Ke tvorbě částic ApoLen nedochází ani za použití jiných testovaných rozpouštědel (methanol, ethanol, či DMA). K efektivní tvorbě částic LipoLen taktéž

efektivně nedocházelo za použití různých kombinací koncentrací jednotlivých složek inkubačních směsí. Výsledky proto nejsou v práci uvedeny.



Obrázek 24: Koncentrace lenvatinibu ve frakcích vzorků použitých pro přípravu částic LipoLen z roztoku lenvatinibu rozpuštěného v DMSO. Frakce „ApoLen- frakce“ zadržována v použitém filtru. „Frakce Filtrát 1“ - frakce vzorku přetékající filtrem po centrifugaci. V obrázku jsou uvedeny hodnoty průměrů ze dvou experimentů. Vzorky použité v experimentech a uvedené v obrázku obsahovaly: 0,25 mg/ml lenvatinibu + 50 µl DLPC: zásobní roztok lenvatinibu rozpuštěného v DMSO s koncentrací 0,25 mg/ml a liposomy tvořené z 50 µl DLPC-sn rozpuštěný v chloroformu. 0,5 mg/ml lenvatinibu + 50 µl DLPC: zásobní roztok lenvatinibu rozpuštěného v DMSO s koncentrací 0,5 mg/ml a liposomy tvořené z 50 µl DLPC-sn rozpuštěný v chloroformu. 0,25 mg/ml lenvatinibu: zásobní roztok lenvatinibu rozpuštěného v DMSO s koncentrací 0,5 mg/ml, kde nebyl přidán DLPC-sn, tudíž nedocházelo ke tvorbě liposomů. 0,25 mg/ml lenvatinibu: zásobní roztok lenvatinibu rozpuštěného v DMSO s koncentrací 0,25 mg/ml, kde nebyl přidán DLPC-sn, tudíž nedocházelo ke tvorbě liposomů.

4.4 KINETIKA OXIDACE VANDETANIBU KATALYZOVANÁ LIDSKÝMI REKOMBINANTNÍMI CYTOCHROMY P450

V této části práce jsme se zabývali dalším protinádorovým léčivem na bázi jeho účinků jako inhibitoru tyrosinkinasy, vandetanibem. V práci jsme se pokusili vysvětlit dříve popsanou skutečnost, že uvedené léčivo je metabolisováno (oxidováno) cytochromy P450, a to CYP3A4, CYP2D6 a CYP1A1 (Indra a kol., rukopis připravený k publikaci). Ke studiu bylo použito sledování enzymové kinetiky oxidace vandetanibu na

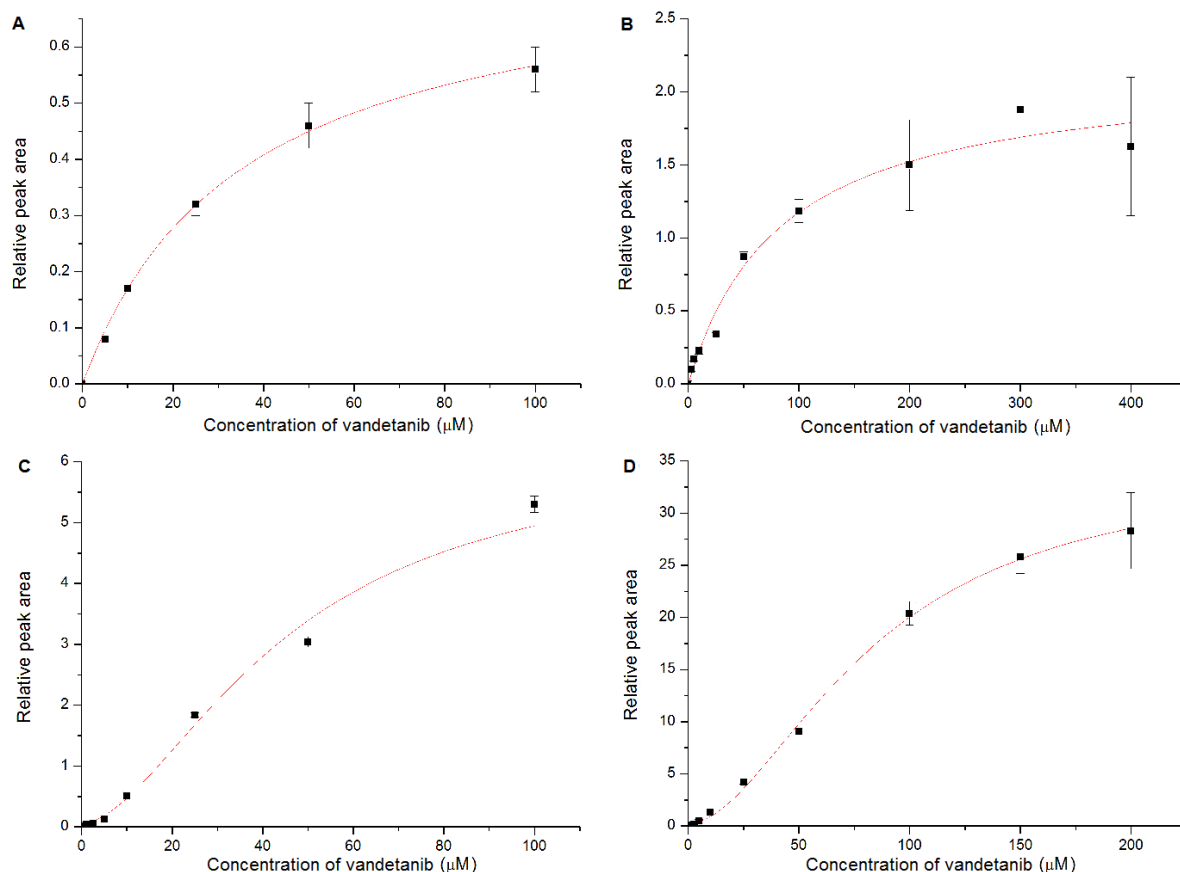
N-desmethylvandetanib cytochromy P450 a počítačového modelování („docking). Analýzou enzymové kinetiky jsme určili charakter závislosti tvorby tohoto metabolitu vandetanibu na koncentraci vandetanibu jako substrátu testovaných cytochromů P450. Pro srovnání výsledků získaných z měření enzymové kinetiky jsme pak použili údaje z výpočtů vazebné afinity vandetanibu v aktivním centru cytochromů P450 a orientace *N*-methylové skupiny molekuly vandetanibu vůči atomu kyslíku ve Sloučenině I testovaných cytochromů P450 pomocí molekulárního „docking“. Tvorba tohoto binárního komplexu je prvním krokem *N*-demethylace vandetanibu katalyzované CYP. Veškeré teoretické výpočty a jejich vyhodnocení bylo provedeno doc. RNDr. Václavem Martínkem, PhD.

Kinetiky oxidace vandetanibu katalyzované CYP1A1 (Obr. 25 A) a CYP2D6 (Obr. 25 B) vykazují hyperbolický charakter. Tato skutečnost signalisuje, že do aktivního centra enzymu se váže jedna molekula substrátu. Tento předpoklad byl potvrzen i počítačovým modelováním molekuly vandetanibu jakožto substrátu CYP1A1 (Obr. 26 A) a CYP2D6 (Obr. 26 B).

Naopak kinetika oxidace vandetanibu katalyzována CYP3A4, a to jak za absence cytochromu *b*₅ (Obr. 25 C), tak i v přítomnosti tohoto hemoproteinu (Obr. 25 D) vykazuje sigmoidální charakter. Hillův index kooperativity $n = 1,73$ pro CYP3A4 a $n = 1,83$ pro CYP3A4 za přítomnosti cytochromu *b*₅ napovídá tomu, že do aktivního místa enzymu se pravděpodobně mohou vázat dvě molekuly substrátu. Přítomnost cytochromu *b*₅ výrazně zvyšuje koncentraci oxidovaného vandetanibu, avšak nemá vliv na kinetiku reakce. Tento předpoklad byl opět potvrzen teoretickými studiemi molekulárního „docking“ do aktivního místa dvou struktur molekul CYP3A4 (1W0E a 6BD7) (Obr. 26 C1 a 26 C2). Do těchto struktur vstupuje molekula vandetanibu s různou orientací. Na obr. XC3 je modelována vazba („docking“) dvou molekul vandetanibu do aktivního centra CYP3A4. Ze studií je patrné, že vazebná vzdálenost do aktivního centra enzymu (CYP3A4 1W0E a 6BD7) je v případě přítomnosti jedné molekuly vandetanibu rovna 3.12 a 3.45 Å. V případě vazby dvou molekul vandetanibu do aktivního centra enzymu je vzdálenost methylové skupiny vandetanibu a kyslíku ve Sloučenině I CYP3A4 výrazně menší, a to 2,67 Å.

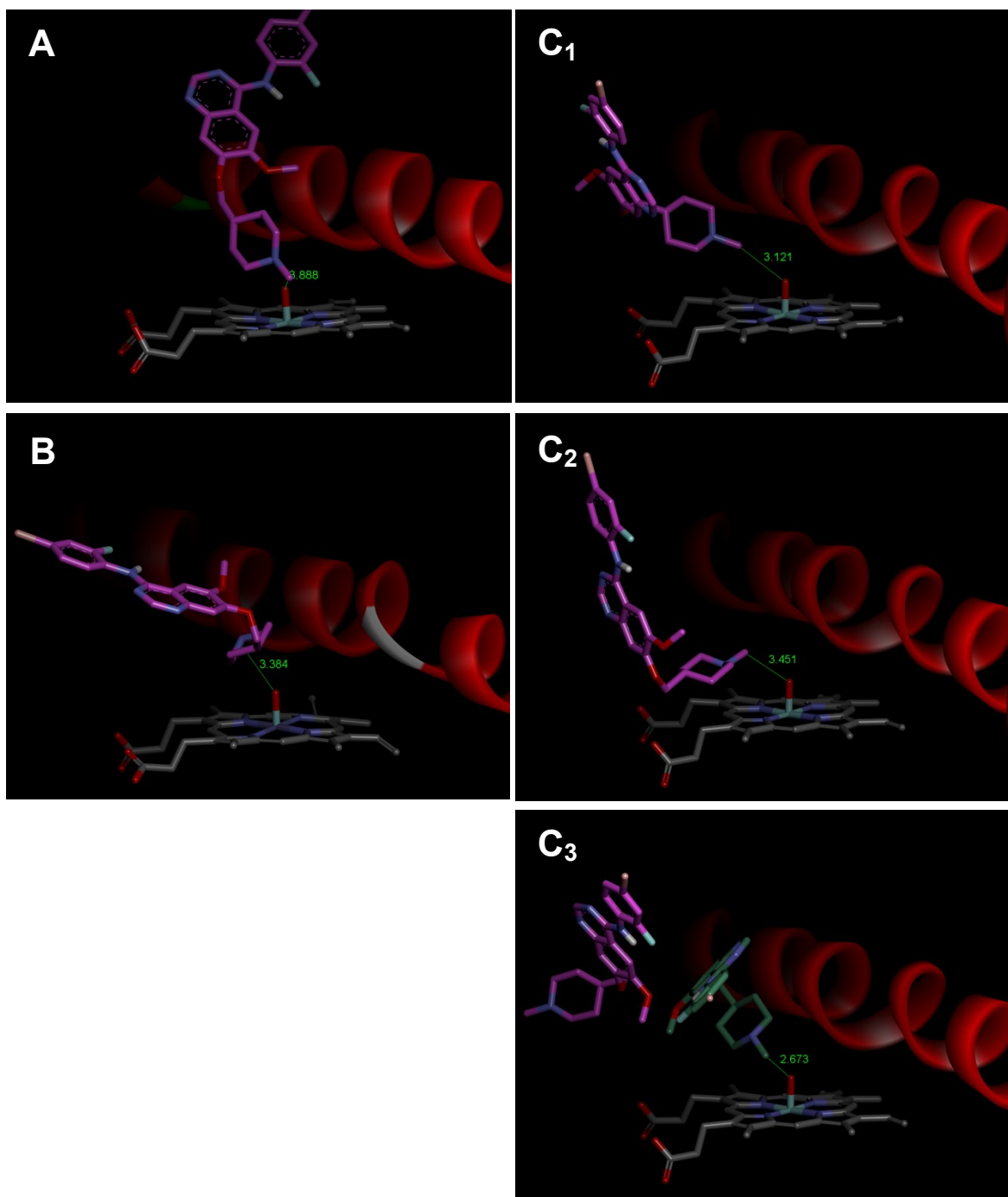
Ze získaných výsledků lze dedukovat, proč je vandetanib nejlépe oxidován na *N*-desmethylvandetanib cytochromem P450 3A4. Do „prostorného“ aktivního centra CYP3A4 mohou být vázány až dvě molekuly vandetanibu, což výsledně vede ke tvorbě

komplexu s enzymem s těsnější vazbou ke kyslíku Sloučeniny I tohoto enzymu. Tedy i k efektivnější oxidaci.



	V_{Max}	K_M	Hillův koeficient
CYP1A1	0.76 ± 0.02	35.12 ± 2.75	NA
CYP2D6	2.16 ± 0.15	84.36 ± 18.14	NA
CYP3A4	6.17 ± 1.32	45.02 ± 13.62	1.73 ± 0.56
CYP3A4+cyt b_5	34.32 ± 1.59	83.65 ± 5.55	1.83 ± 0.13

Obrázek 25: Enzymová kinetika oxidace vandetanibu katalyzována CYP1A1 (A), 2D6 (B), 3A4 (C) a tímto enzymem za přítomnosti cytochromu b_5 (D). Hodnoty \pm směrodatné odchylky uvedené v obrázku byly získané jako průměry ze tří nezávislých měření. Parametry enzymové kinetiky jsou uvedeny v příložené tabulce. Hillův index kooperativity $n=1,73$ pro CYP3A4 a $n=1,83$ pro CYP3A4 za přítomnosti cytochromu b_5 signalisuje, že do aktivního místa enzymu se pravděpodobně vážou dvě molekuly substrátu. V_{max} - maximální rychlost tvorby *N*-desmethylvandetanibu [relativní plochy píkú/min/ μ M CYP]. K_M - Michaelisova konstanta [μ M].



Obrázek 26: Vazebná orientace molekul vandetanibu v aktivním centru Sloučeniny I CYP1A1, CYP2D6 a CYP3A4 zjištěna molekulárním "dockingem". Jednotlivé enzymy jsou representovány následujícími strukturami: CYP1A1 4I8V (A), CYP2D6 3tda (B), CYP3A4 1W0E (C₁); CYP3A4 6BD7 (C₂) a (C₃). Na obrázcích A-C₂ je molekula vandetanibu zobrazena růžovou barvou a molekula hemu šedou barvou. Na obrázku C₃ jsou molekuly vandetanibu zobrazeny růžovou a zelenou barvou a molekula hemu šedou barvou. Červeně je znázorněná struktura představuje část helixu I enzymu. Převzato z (Indra a kol., rukopis připravený k publikaci).

5. DISKUSE

Cílem diplomové práce bylo přispět k poznání cest vedoucích ke zvýšení efektivity protinádorových léčiv při léčbě rakoviny. Zabývali jsme se studiem dvou protinádorových léčiv, konkrétně lenvatinibu a vandetanibu. Obě tato léčiva se využívají při léčbě rakoviny štítné žlázy, kde působí jako inhibitory tyrosinkinas. Prvním cílem diplomové práce byla příprava protinádorového léčiva lenvatinibu ve formě nanotransportéru, a to jak nanočástic apoferritinu (částic ApoLen), tak i lipidových nanočástic (částice LipoLen). Dalším cílem diplomové práce bylo rozšíření poznatků o metabolismu protinádorového léčiva vandetanibu, což by následně mohlo vést ke zvýšení jeho účinnosti při léčbě.

Jelikož protinádorové léčivo ellipticin se již podařilo připravit ve formě apoferritinového nanotransportéru (Indra a kol., 2019), bylo toto léčivo vybráno jako model pro studium interakce léčiva s apoferritinovou nanočásticí počítačovým modelováním. Vytvoření modelu pro elektrostatickou interakci ellipticinu a jeho enkapsulace do apoferritinu počítačovou simulací nám ukázalo, že pro interakci léčiva s dutinou apoferritinu a úspěšnou enkapsulaci musí mít léčivo kladný náboj. Vzhledem k tomu, že experimentálně stanovena hodnota pK_a ellipticinu je 7,05 (Zsilla, 2016), mají molekuly léčiva při přípravě apoferritinových nanočástic kladný náboj a mělo by tedy docházet k tvorbě částic ApoElli. Tento předpoklad byl potvrzen i modelem enkapsulace ellipticinu do dutiny apoferritinu. V případě, kdy byly molekuly léčiva kladně nabitě, došlo k úspěšné enkapsulaci do apoferritinu, na rozdíl od chování neutrálních forem tohoto léčiva. Hodnota pK_a vypočtena pro lenvatinib je 5,1 a tedy se při přípravě apoferritinových nanočástic vyskytuje převážně v neutrální formě. V modelu využívajícím neutrální formy léčiva lenvatinibu bylo ukázáno, že nedochází k jeho enkapsulaci do dutiny apoferritinu a toto léčivo tedy není vhodné pro přípravu nanočástic na bázi apoferritinu. Uvedené teoretické studie mohou být využity pro „screening“ dalších protinádorových léčiv před vlastními experimenty.

Ačkoli teoretické studie signalisovaly, že lenvatinib není vhodný pro enkapsulaci do apoferritinových nanočástic, pokusili jsme se o jejich přípravu experimentálně. V první části experimentální práce jsme se věnovali hledání vhodných rozpouštědel pro lenvatinib, vzhledem k jeho nízké rozpustnosti ve vodě. Jako rozpouštědla lenvatinibu vhodné pro přípravu částic ApoLen byly nalezeny ethanol, ethylenglykol a DMA. Tato rozpouštědla byla následně použita při přípravě částic ApoLen. Z uvedených výsledků vyplývá, že

částice ApoLen nebyly úspěšně připraveny, a to ani za využití různých experimentálních podmínek (kombinace různých koncentrací jednotlivých složek inkubačních směsí a vlivu rozličných hodnot pH na disociaci a asociaci apoferritinových částic). Příprava částic ApoLen nebyla úspěšná.

V další části práce jsme se pokusili připravit jiné nanočástice s lenvatinibem, konkrétně nanočástice lenvatinibu v liposomech (LipoLen). Pro tvorbu liposomů jsme využili 1,2 - didodekanoyl-sn-glycero-3-fosfocholin. Jako rozpouštědlo lenvatinibu jsme použili DMSO, vzhledem k tomu, že účinně rozpouští lenvatinib v kyselém pH, a všechny podmínky vyhovují přípravě částic LipoLen. Částice LipoLen se nám sice podařilo připravit, ale jejich získané množství bylo tak nízké, že nemohou být dále využity při protinádorové léčbě.

V další části diplomové práce jsme se zaměřili na studium metabolismu jiného protinádorového léčiva typu tyrosinkinasového inhibitoru - vandetanibu. Metabolismus vandetanibu totiž ovlivňuje účinnost tohoto léčiva v léčbě nádorů, jmenovitě v léčbě nádorů štítné žlázy (Martin a kol., 2011; příbalový leták léčiva Caprelsa[®] (vandetanib), 2014). Vandetanib je oxidován na demethylovaný produkt *N*-desmethylvandetanib lidskými cytochromy P450, a to zejména CYP3A4, 2D6 a 1A1. Z nich pak především CYP3A4 (Indra a kol., rukopis připravený k publikaci). Co však dosud není známo, je důvod pro tuto efektivní oxidaci. Pro studium metabolismu bylo použito sledování enzymové kinetiky jeho oxidace. Pro srovnání výsledků získaných ze sledování enzymové kinetiky bylo též provedeno i počítačové modelování studující vazebné afinity molekuly vandetanibu v aktivním centru CYP. Jmenovitě orientace molekuly vandetanibu v komplexu s enzymem (orientace vazby a methylové skupiny vandetanibu s atomem kyslíku ve Sloučenině I) CYP 1A1, 2D6 a 3A4 („docking“).

Enzymová kinetika oxidace vandetanibu katalyzována CYP1A1 a CYP2D6 vykazuje hyperbolický charakter. To naznačuje, že do aktivního centra CYP se váže jedna molekula substrátu vandetanibu. Tento předpoklad byl potvrzen i výsledky z počítačového modelování vazby vandetanibu do aktivního centra enzymu. V případě CYP3A4 byla analýza enzymové kinetiky provedena jak bez cytochromu *b*₅ v inkubačních směsích, tak i za jeho přítomnosti (cytochrom *b*₅ totiž výrazně stimuluje oxidaci vandetanibu CYP3A4 (Indra a kol., rukopis připravený k publikaci). V obou případech vykazovala kinetika sigmoidální charakter. Hillův index kooperativity $n = 1,73$ pro CYP3A4 a $n = 1,83$ pro CYP3A4 za přítomnosti cytochromu *b*₅ napovídá tomu, že do aktivního centra enzymu se

může vázat více (minimálně dvě) molekul vandetanibu. Tento předpoklad byl potvrzen výsledky z počítačového modelování. Ty ukazují, že při vazbě dvou molekul vandetanibu do aktivního centra byla vazebná orientace *N*-methylové skupiny vandetanibu výhodnější pro *N*-demethylační reakce. Vzhledem k tomu, že se do „prostorného“ aktivního centra CYP3A4 mohou vázat dvě molekuly substrátu, je tak oxidace katalyzována těmito enzymy efektivnější než v případě CYP1A1 a 2D6.

6. ZÁVĚR

Cílem diplomové práce bylo poznání cest ke zvýšení efektivity dvou léčiv připravených na bázi inhibitorů tyrosinkinas lenvatinibu a vandetanibu. Konkrétně byla studována příprava lenvatinibu v nanočásticové formě (v apoferritinu) a dále oxidace vandetanibu cytochromy P450.

Cíle práce byly splněny:

- V práci byl připraven model mechanismu interakce protinádorových léčiv lenvatinibu a ellipticinu s dutinou apoferritinu a jejich enkapsulace do apoferritinových částic. Získaný model objasňuje mechanismus konstrukce nanočástic a umožňuje tak „screening“ vhodných protinádorových léčiv ještě před samotnou experimentální přípravou.
- Teoretické i experimentální přístupy použité v diplomové práci prokázaly, že lenvatinib není vhodným léčivem pro přípravy nanočástic lenvatinibu v apoferritinu.
- V diplomové práci byly připraveny nanočástice lenvatinibu v liposomech, ale pouze ve velmi malém množství. Pro další využití v protinádorové léčbě se tedy zdají být nepříliš vhodné.
- Studium enzymové kinetiky oxidace vandetanibu na *N*-desmethylvandetanib katalyzované CYP1A1, 2D6 a 3A4 prokazuje, že do aktivního místa cytochromu P450 3A4 se mohou vázat dvě molekuly substrátu (vandetanibu), na rozdíl od CYP1A1 a CYP2D6, které vážou jednu molekulu substrátu. Tyto výsledky byly potvrzeny teoretickými studiemi za použití molekulárního „dockingu“.
- Vazba dvou molekul substrátu do aktivního místa CYP3A4 vysvětluje efektivnější oxidaci vandetanibu, než je tomu v případě CYP1A1 a 2D6.

POUŽITÁ LITERATURA:

Alberts B., Johnson A., Lewis J., Morgan D., Raff M., Roberts K. a Walter P. (2014) Cancer, v knize Molecular biology of the cell, 6. vydání, Garland Science (New York)

Ambudkar S. V., Dey S., Hrycyna Ch. A., Ramachandra M., Pastan I. a Gottesman M. M. (1999) Biochemical, Cellular and Pharmacological Aspects of the Multidrug Transporter, Annual Review of Pharmacology and Toxicology 39, 361-398

Baudino T. A. (2015) Targeted Cancer Therapy: The Next Generation of Treatment, Current Drug Discovery Technologies 12, 3-20

Bennis S., Chapey Ch., Couvreur P. a Robert J. (1984) Enhanced Cytotoxicity of Doxorubicin Encapsulated in Polyisohexylcyanoacrylate Nanospheres Against Multidrug-resistant Tumor Cell Culture, European Journal of Cancer 30, 89-93

Berg J. M. a Tymoczko J. L. a Streyer L. (2006) DNA Replication, Repair and Recombination, v knize Biochemistry, 6. vydání, W. H. Freeman and Company (New York)

Bertram J. S. (2001) The Molecular Biology of Cancer. Molecular Aspects of Medicine 21, 167-223

Beukers R., Iljstra J a Berends W. (1959) The Effect of UV light on Some Components of Nucleic Acids Recueil 78, 883-887

Blume-Jensen P. a Hunter T. (2001) Oncogenic Kinase Signalling. Nature 411, 355-365

Bozzuto G. a Molinari A. (2015) Liposomes as Nanomedical Devices, International Journal of Nanomedicine 10, 975-999

Bray F., Ferlay J., Soerjomataram I., Siegel R. L., Torre L. A. a Jemal A. (2018) Global Cancer Statistics 2018: GLOBOCAN Estimates of Incidence and Mortality Worldwide for 36 Cancers in 185 Countries. CA: A Cancer Journal for Clinicians 68, 394-424

Bretscher M. S. a Thomson J. N. (1983) Distributon of Ferritin Receptors and Coated Pits on Giant HeLa Cells, EMBO Journal 2, 599-603

Brunton L., Chabner B. a Knollman B. (2011) Drug Metabolism, v knize Goodman and Gilman's The Pharmacological Basis of Therapeutics, 12 vydání, The McGraw Hill Companies (New York)

Calculation | pKa. [Online]. Dostupné z <https://chemicalize.com/#/calculation>. [staženo 3. – dub-2018]

Carlomagno F., Vitagliano D., Guida T., Ciardiello F., Tortora G., Vecchio G., Ryan A.J., Fontanini G. a Fusci A. a Santoro M. (2002) ZD6474, an Orally Available Inhibitor of KDR Tyrosine Kinase Activity, Efficiently Blocks Oncogenic RET Kinases, Cancer Research 62, 7284-7290

Cashman J. R. (2000) Human Flavin-Containing Monooxygenase: Substrate Specifity and Role in Drug Metabolism, Current Drug Metabolism 1, 181-191

Commander H., Whiteside G. a Perry C. (2011) Vandetanib: First Global Approval, Drugs 71, 1355-1365

Croce C.M. (2008) Molecular Origins of Cancer: Oncogenes and Cancer. A New England Journal of Medicine 358, 502-511

Crocker J. a Murray P. G. (2003) Molecular Biology in Cellular Pathology, John Wiley & Sons (Chichester)

Croom E. (2012) Chapter Three – Metabolism of Xenobiotics of Human Environments, Progress in Molecular Biology and Translational Science 112, 31-88

Cruciani G., Valeri A., Goracci L., Pellegrino R. M., Buonerba F. a Baronis M. (2014) Flavin Monooxygenase Metabolism: Why Medical Chemists Should Matter, Journal of Medicinal Chemistry 57, 6183-6196

Dalla-Favera R., Bregni M., Erikson J., Patterson D., Gallo R. C. a C. M. Croce (1982) Human *C-myc Onc* Gene is Located on the Region of Chromosome 8 That is Translocated in Burkitt Lymphoma Cells, Proceeding of the National Academy of Sciences 79, 7824-7827

Daraee H., Etemadi A., Kouhi M., Alimirzalu S. a Akbarzadeh A. (2016) Application of Liposomes in Medicine and Drug Delivery, Artificial Cells, Nanomedicine and Biotechnology 44, 381-391

Dawson J. H. a Sono M. (1987) Cytochrome P450 and Chloroperoxidase: Thiolate-Liganded Heme Enzymes. Spectroscopic Determination of Their Active Site Structures and Mechanistic Implications of Thiolate Ligation, Chemical Reviews 87, 1255-1276

Dickens E. a Ahmed S. (2018) Principles of Cancer Treatment by Chemotherapy, Surgery (Oxford) 36, 134-138

Di Leva G., Garofalo M. a Croce C.M. (2013) MicroRNAs in Cancer. Annual Review of Pathology 9, 287–314

Dolphin C. I., Cullingford T. E., Shephard E. A., Smith R. a Phillips T. R. (1996) Differential Developmental and Tissue-specific Regulation of Expression of the Genes Encoding Three Members of the Flavin-containing Monooxygenase Family of Man, FMO 1, FMO 3 and FMO 4, European Journal of Biochemistry 235, 683-689

Dostalova S., Vasickova K., Hynek D., Krizkova S., Richtera L., Vaculovicova M., Eckschlager T., Stiborova M., Heger Z. a Adam V. (2017) Apoferritin as an Ubiquitous Nanocarrier with Excellent Shelf Life, Journal of Nanomedicine 12, 2265-2278

Elder K. a Barber M. D. (2018) The Role of Surgeon in Cancer Care, Surgery (Oxford) 36, 106-110

Espinosa A., Di Corato R., Kolosnjaj-Tabi J., Flaud P., Pellegrino T. a Wilhelm C. (2016) The Dualiti of Iron Oxide Nanoparticles in Cancer Therapy: Amplification of

heating Efficiency by Magnetic Hyperthermia and Photothermal Bimodal Treatment, ACS Nano 2 (10) 2436- 2446

Estelrich J., Sánchez-Martín M. J. a Busquest M. A. (2015) Nanoparticles in Magnetic Resonance Imaging: From Simple to Dual Contrast Agents, International Journal of Nanomedicine 10, 1727-1741

Farsangi-Hojjat M. (2014) Small-Molecule Inhibitor of Receptor Tyrosine Kinases: Promising Tools for Targeted Cancer Therapies, International Journal of Molecular Sciences 15, 13768-13801

fda.gov |drugs | informationdrugs . [Online] . Dostupné z <https://www.fda.gov/drugs/informationondrugs/ucm437515.htm>. [staženo 8. – dub - 2018]

Feenstra K.A., Hess B. a Berendsen H.J.C. (1999) Improving Efficiency of Large Time-scale Molecular Dynamics Simulations of Hydrogen-rich Systems, Journal of Computational Chemistry 20, 786–798

Felsher D. W. a Bishop M.J. (1999) Reversible Tumorigenesis by MYC in Hematopoietic Lineages. Molecular Cell 4, 199-207

Femando J. a Jones R. (2015) The Principles of Cancer Treatment by Chemotherapy, Surgery (Oxford) 33, 131-135

Ford G. C., Harrison P. M., Rice D. W., Smith J. M. A., Treffry A., White J. L. a Yariv J. (1984) Ferritin: Design and Formation of an Iron-storage Molecule, Philosophical Transactions of the Royal Society of London 304, 551-565

Glieder A., Winkler M., Geier M., Hanlon S. P. a Nidetzky B. (2018) Human Enzymes for Organic Synthesis, Angewandte Chemie International Edition 57, 13406-13423

Gotink K. J. a Verheul H. M. W. (2010) Anti-angiogenic Tyrosine Kinase Inhibitors: What is Their Mechanism of Action?, Angiogenesis 13, 1-14

Gruenke L. D., Konopka K. a Cadieu M. a Waskell L. (1995) The Stoichiometry of the Cytochrome-P450-catalyzed Metabolism of Methoxyflurane and Benzphetamine in the Presence and Absence of Cytochrome *b₅*, The Journal of Biological Chemistry 270, 24707-24718

Gu N. a Li Y. (2010) Thermodynamics of Charged Nanoparticle Adsorption on Charge-Neutral Membranes: A Simulation Study, Journal of Physical Chemistry 114, 2749-2754

Harrison P. M., Hoy T. G., Macara I. G. a Hoare R. J. (1974) Ferritin Iron Uptake and Release, Biochemical Journal 143, 445-451

Hashizume H., Baluk P., Morikawa S., McLean J. W., Thurstin G., Roberge S., Jain R. K. a McDonald D. M. (2000) Openings between Defective Endothelial Cells Explain Tumor Vessel Leakiness, American Journal of Pathology 156, 1363-1380

Hasler J. A., Estabrook R., Murray M., Pikuleva I., Waterman M., Capdevila J., Holla V., Helvig Ch., Falck J. R., Farrell G., Kaminski L. S., Spivack S. D., Boitier E. a Beaune P. (1999) Human cytochromes P450, Molecular Aspects of Medicine 20, 1-137

Heger Z., Skalickova S., Zitka O., Adam V. a Kizek R. (2014) Apoferritin Applications in Nanomedicine, Nanomedicine (Lond.) 9, 2233-2245

Higgins G. S., O' Cathail S. M., Muschel R. J. a McKenna G.W. (2015) Drug radiotherapy combinations: Review of Previous Failures and Reasons for Future Optimism, Cancer Treatment Reviews 41, 105-113

Hildebrandt A. a Estabrook R. W. (1971) Evidence for the Participation of Cytochrome *b₅* in Hepatic Microsomal Mixed- Function Oxidation Reactions, Archives of Biochemistry and Biophysics 143, 66-79

Hoffmann M. F., Preissner S. C., Nickel J., Dunkel M. a Preissner R. a Preissner S. (2014) The Transformer database: Biotransformation of Xenobiotics, Nucleic Acids Research 42, 1113-1117

Hubbard S. R. a Till J. H. (2000) Protein Tyrosine Kinase Structure and Function, Annual Review of Biochemistry 69, 373-398

Humphrey W., Dalke A. a Schulten K. (1996) VMD: Visual Molecular Dynamics, Journal of Molecular Graphics 14, 33-8

Chan W. C. W. a Chuthrani B. D. (2007) Elucidating the Mechanism of Cellular Uptake and Removal of Protein-Coated Gold Nanoparticles of Different Sizes and Shapes, Nano Letters 7, 1542-1550

Chau N.G. a Haddad R. I. (2013) Vandetanib for the Treatment of Medullary Thyroid Cancer, Clinical Cancer Research 19, 524-529

Cheatham T.E., Miller J.L., Fox T., Darden T.A. a Kollman P.A. (1994) Molecular Dynamics Simulations on Solvated Biomolecular Systems: The Particle Mesh Ewald Method Leads to Stable Trajectories of DNA, RNA, and Proteins, Journal of American Chemical Society 117, 4193–4194

Chen G., Zhu X., Meng F., Yu Z. a Li G. (2008) Apoferritin as a Bionanomaterial to Facilitate the Electron Transfer Reactivity of Hemoglobin and the Catalytic Activity Towards Hydrogen Peroxide, Bioelectrochemistry 72, 77-80

Chithrani B. D. a Ghazani A. A. a Chan W. C. W. (2006) Determining the Size and Shape Dependence of Gold Nanoparticle Uptake into Mammalian Cells, Nano Letters 6, 662-668

Cho K., Wang X., Nie S., Chen Z. a Shin D. M. (2008) Therapeutic Nanoparticles for Drug Delivery in Cancer, Clinical Cancer Research 14, 1310-1316

Ibrahim-Ouali M. a Dumur F. (2018) Recent Syntheses of Ellipticine and its Derivatives, Arkivoc 2018, 1-28

Indra R., Černá T., Heger Z., Hraběta J., Wilhelm M., Dostálová S., Lengálová A., Martínková M., Adam V., Eckschlager T., Schmeiser H. H., Volker A. M. a Stiborová M. (2019) Ellipticine-loaded Apoferritin Nanocarrier Retains DNA Adduct-based Cytochrome P450-Facilitated Toxicity in Neuroblastoma Cells, *Toxicology* 419, 40-54

Indra R., Pompach P., Martínek V., Takácsová P., Vavrová K., Heger Z., Adam V., Eckschlager T., Kopečková K., Arlt V. M. a Stiborová M. (2019) Identification of Enzymes Oxidizing the Tyrosine Kinase Inhibitor Vandetanib and Explanation of the High Efficiency of Cytochrome P450 3A4 to Generate *N*-desmethylvandetanib, *rukopis připravený k publikaci*

Iwai K., Maeda H. a Konno T. (1984) Use of Oily Contrast Medium for Selective Drug Targeting to Tumor: Enhanced Therapeutic Effect and X-Ray Image 1, *Cancer Research* 44, 2115-2121

Jaffray D. A. (2012) Image-guided Radiotherapy: From Current Concept to Future Perspectives, *Nature Reviews Clinical Oncology* 9, 688-699

Jakalian A., Jack D.B. a Bayly C.I. (2002) Fast, Efficient Generation of High-quality Atomic Charges. AM1-BCC model: II. Parametrization and Validation, *Journal of Computational Chemistry* 23, 1623–1641

Jorgensen W.L., Chandrasekhar J., Madura J. a Klein M.L. (1983) Comparison of Simple Potential Functions for Simulating Liquid Water, *Journal of Chemical Physics*, 926–935

Juntilla M. R. a Evan G. I. (2009) p53 - a Jack of all Trades but Master of None. *Nature Reviews Cancer* 11, 821-829

Katzung B. G., Masters S. B. a Trevor A. J. (2012) Drug Biotransformation, v knize *Basic and Clinical Pharmacology*, 12. vydání, McGraw Hill Medical (New York)

Kerr D. J., Haller D. G., van de Velde C. J. H., Baumann M. (2016) Oxford Textbook of Oncology, 3. vydání, Oxford University Press (Oxford)

Kilic M. A., Ozlu E. a Calis S. (2012) A Novel Protein-Based Anticancer Drug Encapsulated Nanosphere: Apoferritin-Doxorubicin Complex, Journal of Biomedical Nanotechnology 8, 508-514

Kim M., Rho Y., Jin K. S., Ahn B., Jung S., Kim H. a Ree M. (2011) pH-Dependent Structures of Ferritin and Apoferritin in Solution: Disassembly and Reassembly, Biomacromolecules 12, 1629-1640

Klein-Goldberg A., Maman S. a Witz I. P. (2014) The Role Played by the Microenvironment in Site-specific Metastasis. Cancer letters 352, 54-58

Konijn A. M., Meyron-Holtz E. G., Matzner Y. a Ben-Bassat H. (1990) Specific Binding of Placental Acidic Isoferritin to Cells of the T-cell Line HD-MAR, FEBS letters 263, 229-232

Kumar D., Singh N. a Tempe A. (2017) Evidence Based Clinical Gynecology, Japan Medical Journal (New Delhi)

Lawson D. M., Treffry A., Artymiuk P. J., Harrison P. M., Yewdall S. J., Luzzago A., Cesareni G., Levi S. a Arosio P. (1989) Identification of the Ferroxidase Centre in Ferritin, FEBS letters 254, 207-210

Le Grand S., Gotz A.W. a Walker R.C. (2013) SPFP: Speed without Compromise - A Mixed Precision Model for GPU Accelerated Molecular Dynamics Simulations, Computer Physics Communications 184, 374–380

Lee E. Y. H. P. a Muller W. J. (2010) Oncogenes and Tumor Suppressor Genes, Cold Spring Harb Perspect Biology 2, 1-18

Lehmann A. R., Kirk-bell S., Arlett C. F., Paterson M. C., Lohman P. H. M., de Weerd-Kasteleinl E. A. a Bootsman D. (1975) Xenoderma Pigmentosum Cells with Normal Levels of Excision Repair Have a Defect in DNA Synthesis after UV-Irradiation. Proceeding of National Academy of Sciences 72, 219-223

Lemmon M. A. a Schlessinger J. (2010) Cell Singalling by Tyrosine Kinases, Cell 141, 1117-1134

Levi S., Santambrogio P., Cozzi A., Rovida E., Corsi B., Tamborini E., Spada S., Albertini A. a Arosio P. (1994) The Role of L-chain in Ferritin Iron Incorporation, Journal of Molecular Biology 238, 649-654

Levitzky A. (2012) Tyrosine Kinase Inhibitors: Views of Selectivity, Sensitivity and Clinical Performance, Annuaul Reviews of Pharmacology and Toxicology 53, 9.1-9.25

Li Y., Chen X. a Gu N. (2008) Computational Investigation of Interaction between Nanoparticles and Membranes: Hydrophobic/Hydrophilic Effect, Journal of Physical Chemistry 112, 16647-16653

Lifson S. a Warshel A. (1968) A Consistent Force Field for Calculation on Conformations, Vibrational Spectra and Enthalpies of Cycloalkanes and n-Alkane Molecules", Journal of Physical Chemistry 49, 5116

Lin S. a Gregory R. I. (2015) MicroRNA Biogenesis Pathways in Cancer. Nature Reviews Cancer 15, 321-333

Liu G., Wang J., Wu H. a Lin G. (2006) Versatile Apoferritin Nanoparticle Labels for Assay of Protein, Analytical Chemistry 78, 7417-7423

Lodish H., Berk A., Kaiser C.A., Krieger M., Bretscher A., Ploegh H., Amon A., Scott M.P. a Martin K. (2013) Cancer, v knize Molecular Cell Biology, 7. vydání, W.H. Freeman and company (New York)

Luo J. a Solimini N.L a Elledge S. J. (2009) Principles of Cancer Therapy: Oncogene and Non-Oncogene addiction, Cell 136, 823-837

Mahta A. I., Kheirkhah P., Denyer S., Arnone G. D., Bhimani A. D., Esfahani D. R., Aguilar T., Zakrzewski J., Venugopal I., Habib N., Gallia G. L., Linninger A. a Charbel F. T. (2018) Magnetic Drug Targeting: A Novel Treatment for Intramedullary Spinal Cord Tumors, Scientific Reports 8 (11417)

Ma-Ham A., Tang Z., Wu H., Wang J. a Lin Y. (2009) Protein-Based Nanomedicine Platforms for Drug Delivery, Small 5, 1706-1721

Ma-Ham A., Wu H., Wang J., Kang X., Zhang Y. a Lin Y. (2011) Apoferritin-based Nanomedicine Platform for Drug Delivery: Equilibrium Binding Study of Daunomycin with DNA, Journal of Materials Chemistry 21, 8700-8708

Maman S. a Witz I. P. (2018) A History of Exploring Cancer in Context, Nature Reviews Cancer 18, 359-376

Markman M. (2006) Pegylated Liposomal Doxorubicin in the Treatment of Cancers of the Breast and Ovary, Expert Opinion on Pharmacotherapy 7, 1469-1474

Martin P., Oliver S., Robertson J., Kennedy S. J., Read J. a Duvauchelle T. (2011) Pharmacokinetic Drug Interactions with Vandetanib during Coadministration with Rifampicin or Itraconazole, Drugs in R&D 11, 37-51

Matsui J., Yamamoto Y., Funahasi Y., Tsuruoka A., Watanabe T., Wakabayashi T., Uenaka T. a Asada M. (2008) E7080, A Novel Inhibitor that Targets Multiple Kinases, Has potent Antitumor Activities Against Stem Cell Factor Producing Human Small Cell Lung Cancer H146, Based on Angiogenesis Inhibition, International Journal of Cancer 122, 664-671

McQueen Ch. A. (2018) Toxicokinetics: Biotransformation of Toxicants, v knize Comprehensive Toxicology, Elsevier (Oxford)

Mayne C.G., Saam J., Schulten K., Tajkhorshid E. a Gumbart J.C. (2013) Rapid Parametrization of Small Molecules Using the Force Field Toolkit, Journal of Computational Chemistry 34, 2757-2770

MetaCentrum: <https://metavo.metacentrum.cz/>

Miyamoto S. a Kollman P.A. (1992) Settle: An analytical Version of the SHAKE and RATTLE Algorithm for Rigid Water Models, Journal of Computational Chemistry 13, 952–962

Miele E., Spinelli G. P., Miele E., Tomao F. a Tomao S. (2009) Albumin-bound Formulation of Paclitaxel (Abraxane® ABI-007) in the Treatment of Breast Cancer, International Journal of Nanomedicine 4, 99-105

Miller J.A. a Miller E.C. (1975) Metabolic Activation and Reactivity of Chemical Carcinogens. Mutation Research 33, 25-26

Mol R. P. a Balan A. (2013) Oncogenes as Therapeutic Targets in Cancer: A Review, IOSR-JDMS 5, 46-56

Murphy P. R. a MacFarlanne L. (2010) MicroRNA: Biogenesis, Function and Role in Cancer, Current Genomics 11, 537-561

Nelson D. R., Kamataki T., Waxman D., Guengerich P., Estabrook R., Feyereisen R., Gonzalez F., Coon M. J., Gunsalus I. C., Gotoh O., Okuda K. a Nebert D. W. (1993) The P450 Superfamily: Update on New Sequences, Gene Mapping, Accession Numbers, Early Trivial Names of Enzymes and Nomenclature, DNA and Cell Biology 12, 1-51

Noshiro M., Harada N. a Omura T. (1979) Imunochemical Study on the Participation of Cytochrome *b₅* in Drug Oxidation Reactions of Mouse Liver Microsomes, Biochemical and Biophysical Research Communications 91, 207-213

Ortiz de Montellano P.R. (2005) Substrate Oxidation by Cytochrome P450 Enzymes, v knize Cytochrome P450: Structure, Mechanism and Biochemistry, 3 vydání, Kluwer Academic (New York)

Vann K. R., Ergun I., Zencir S., Oncuoglu S., Osheroff N. a Topcu Z. (2016) Inhibition of Human Topoisomerase I α by Two Novel Ellipticine Derivatives, Bioorganic & Chemical Letters 26, 1809-1812

Papasotiriou I., Toloudi M., Apostolou P., Chatziioannou M., Kourtidou E., Vlachou I., Mimikakou G. a Chlichlia A. (2014) Recent Developements in Cancer Treatment: A Review, Farmaceutical Regulatory Affairs 1, 1-4

Parkinson A., Ogilvie B.G., Buckley D.B., Kazmi F., Czerwinski M. a Parkinson O. (2017) Biotransformation of Xenobiotics, v knize Casarett and Doull's Toxicology: The Basic Science of Poisons, 8. vydání, The McGraw Hill Companies (New York)

Pecorino L. (2012): Metastasis, v knize Molecular biology of cancer: Mechanisms, Targets and Therapeutics, 3. Vydání, Oxford University Press (Oxford)

Phillips J. C., Braun R., Wang W., Gumbart J., Tajkhorshid E., Villa E., Chipot C., Skeel R.D., Kalé L. a Schulten K. (2005), Scalable Molecular Dynamics with NAMD, Journal of Computational Chemistry 26, 1781-1802

Porter T. D. a Lee Elmore C. (2002) Modification of the Nucleotide Cofactor-binding Site of Cytochrome P-450 Reductase to Enhance Turnover with NADH *in Vivo*, The Journal of Biological Chemistry 277, 48960-48964

Porth C. M. (2014) Pathophysiology, 4. vydání. Wolters Kluwer (Philadelphia)

příbalový letáček léčiva Caprelsa® (2014) Astra Zeneca

Reed M. (2009) Principles of Cancer Treatment by Surgery, Surgery (Oxford) 27, 178-181

Rees M. a Sweetland H. (2015) Role of Surgeons in Management of Cancer, Surgery (Oxford) 33, 112-116

Reddy K. B. (2015) MicroRNA (MiRNA) in Cancer, Cancer Cell International 15, 1-6

Roe D.R. a Cheatham T.E. (2013) PTRAJ and CPPTRAJ: Software for Processing and Analysis of Molecular Dynamics Trajectory Data, Journal of Chemical Theory Computation 9, 3084–3095

Rosenthal E., Poizot-Martin I., Saint-Marc T., Spano J. P., Cacoub P. a DNX študijná skupina (2002) Phase IV Study of Liposomal Daunorubicin (DaunoXome) in AIDS-Related Kaposi Sarcoma, American Journal of Clinical Oncology 25, 57-59

Salomon-Ferrer R., Case D.A. a Walker R.C. (2013) An Overview of the Amber Biomolecular Simulation Package, WIREs Computational Molecular Science 3, 198-210

Samuels E. R. a Sevrioukova I. (2018) Inhibition of Human CYP3A4 by Rationally Designed Ritonavir-Like Compounds: Impact and Interplay of the Side Group Functionalities, Molecular Pharmacology 15, 279-288

Scott L.J. (2015) Lenvatinib: First Global Approval, Drugs 75, 553-560

Ségaligny A. I., Tellez-Gabriel M., Heymann M. F. a Heymenn D. (2012) Receptor Tyrosine Kinases: Characterisation, Mechanism of Action and Therapeutic Interests for Bone Cancer, Journal of Bone Oncology, 1-12

Sikora A., Shard A. G. a Minelli C. (2016) Size and ζ -Potential Measurement of Silica Nanoparticles in Serum Using Tunable Resistive Pulse Sensing, Langmuir 32, 2216-222

Simsek E. a Kilic M. A. (2005) Magic ferritin: A Novel Chemotherapeutic Encapsulation Bullet, Journal of Magnetism and Magnetic Materials 293, 509-513

Solovyov I.A., Korol A. a Solovyov A. (2017) Multiscale Modeling of Complex Molecular Structure and Dynamics with MBN Explorer, Springer (Frankfurt)

Song S., Rosen K. M. a Corfas G. (2013) Biological Function of Nuclear Receptor Tyrosine Kinase Action, Cold Spring Harb Perspect Biol. 5, 1-10

Steinmetz N. F. a Lin R. D. (2018) Tobacco Mosaic Virus Delivery of Mitoxantrone for Cancer Therapy, Nanoscale 10, 16307-16313

Stiborová M., Sejbal J., Bořek-Dohalská L., Aimová D., Poljaková J., Forsterová K., Rupertová M., Weisner J., Hudeček J., Weissler M. a Frei E. (2004) The Anticancer Drug Ellipticine Forms Covalent DNA Adducts, Mediated by Human Cytochromes 450, through Metabolism to 13-Hydroxyellipticine and Ellipticine N^2 -Oxide, Cancer Research 64, 8374-8380

Sutmann G., Gibbon P. a Lippert T. (2010) Fast Methods for Long-range Interactions in Complex Systems, 6. vydání, Jülich Forschungszentrum, (Jülich)

Talmadge E.J. a Fidler I.J. (2010) AACR Centennial Series: The Biology of Cancer Metastasis: Historical Perspective, Cancer Research 70, 5649-5669

Timbrell J. A. a Marrs T. C. (2009) Biotransformation of Xenobiotics, v knize General, Applied and Systems Toxicology, John Wiley and Sons (New York)

Tohyama O., Matsui J., Kodama K., Hata-Sugi N., Kimura T., Okamoto K., Minoshima Y., Iwata M. a Funahashi Y. (2015) Antitumor Activity of Lenvatinib (E7080): An Angiogenesis Inhibitor That Targets Multiple Receptor Tyrosine Kinases in Preclinical Human Thyroid Cancer Models, Journal of Thyroid Research 2014, 1-13

Tomasetti C., Vogelstein B. a Li L. (2017) Stem Cell Divisions, Somatic Mutations, Cancer Etiology and Cancer Prevention, Science 355, 1330-1334

Urruticoechea A., Alemany R., Balart J., Villanueva A., Vinals F. a Capellá G., (2010) Recent Advances in Cancer Therapy: An Overview, Current Pharmaceutical Designs 16, 3-10

van Leeuwen R. W. F., van Gelder T., Mathijssen R. H. J. a Jansman F. G. A (2014) Drug-drug Interactions with Tyrosine-kinase Inhibitors: A Clinical Perspective, *The Lancet Oncology* 15, 315-326

Vanommeslaeghe K. a MacKerell Jr. A.D. (2015) CHARMM Additive and Polarizable Force Fields for Biophysics and Computer-aided Drug Design, *Biochimica et Biophysica Acta* 1850, 861-871

Verlet L. (1967) Computer "Experiments" on Classical Fluids. I. Thermodynamical Properties of Lennard–Jones Molecules, *Physical Reviews* 159, 98–103

Walsh A. A., Szklarz G. D. a Scott E .E (2013) Human Cytochrome P450 1A1 Structure and Utility in Understanding Drug and Xenobiotic Metabolism, *Journal of Biological Chemistry* 288, 12932-12943

Wang A., Stout C. D., Zhang Q. a Johnson E. F. (2015) Contributions of Ionic Interactions and Protein Dynamics to Cytochrome P450 2D6 (CYP2D6) Substrate and Inhibitor Binding, *Journal of Biological Chemistry* 290, 5092-5104

Wang A. Z., Langer R. a Farokhzad O. C. (2012) Nanoparticle Delivery of Cancer Drugs, *Annual Review of Medicine* 63, 185-198

Wang J., Wolf R.M., Caldwell J.W., Kollman P.A. a Case D.A. (2004) Development and testing of a general amber force field, *Journal of Computational Chemistry* 25, 1157–1174

Ward J. F. (1988) DNA Damage Produced by Ionizing Radiation in Mammalian Cells: Identities, Mechanisms of Formation, and Reparability. *Progress in Nucleic Acid Research and Molecular Biology* 35, 95-125

Wedge S. R., Ogilvie D. J., Dukes M., Kendrew J., Chester R., Jackson J. A., Boffey S. J., Valentine P.J., Curwen J.O., Musgrove H.L., Graham G.A., Hughes G.D., Thomas

A.P., Stokes E.S.E., Curry B., Richmond G.H.P., Wadsworth P.F., Bigley A.L. a Hennequin L.F (2002) ZD6474 Inhibits Vascular Endothelial Growth Factor Signaling, Angiogenesis, and Tumor Growth following Oral Administration, *Cancer Research* 62, 4645-4655

Weinberg R.A. (2007) a: *Nature of Cancer*, v knize *The biology of Cancer*, 1. vydání, Garland Science (New York)

Weinberg R.A. (2007) b: *Cellular Oncogenes*, v knize *The biology of Cancer*, 1. vydání, Garland Science (New York)

Weinberg R.A. (2007) c: *The Rational Treatment of Cancer*, v knize *The Biology of Cancer*, 1. vydání, Garland Science (New York)

Weinberg R. A., Lambert A. W. a Pattabiraman D. R. (2016) Emerging Biological Principles of Metastasis, *Cell* 168, 670-691

Weinstein B.I. (2002) Addiction to Oncogenes: The Achilles Heal of Cancer, *Science* 297, 63-64

Wells Jr. S.A., Robinson B.G., Gagel R.F., Dralle H., Fagin J.A., Santoro M., Baudin E., Elisei R., Jarzab B., Vaselli J.R., Read J., Langmuir P., Ryan A.J. a Schlumberger M.J. (2012) Vandetanib in Patients With Locally Advanced or Metastatic Medullary Thyroid Cancer: A Randomized, Double-Blind Phase III Trial, *Journal of Clinical Oncology* 30, 134-141

Werck-Reichhart D. a Feyereisen R. (2000) Cytochromes P450: A Success Story, *Genome Biology* 1, 1-9

Williams D. E. a Krueger S. K. (2005) Mammalian Flavin-containing Monooxygenases: Structure/function, Genetic Polymorphism and Role in Drug Metabolism, Pharmacology and Therapeutics 106, 357-387

Williams P. A., Cosme J., Vinkovic D. M., Ward A., Angove H. C., Day P. J., Vonrhein C., Tickle I. J. a Jhoti H. (2004) Crystal Structures of Human Cytochrome P450 3A4 Bound to Metirapone and Progesterone, *Science* 305, 683-6886

Yamamoto Y., Matsui J., Matsushima T., Obaishi H., Miyazaki K., Nakamura K., Tohyama O., Semba T., Yamaguchi A., Hoshi S.S., Mimura F., Haneda T., Fukuda Y., Kamata J., Takahashi K., Matsukura M., Wakabayashi T., Asada M., Nomoto K., Watanabe T., Dezso Z., Yoshimatsu K., Funahashi Y. a Tsuruoka A. (2014) Lenvatinib, an Angiogenesis Inhibitor Targeting VEGFR/FGFR, Shows Broad Antitumor Activity in Human Tumor Xenograft Models Associated with Microvessel Density and Pericyte Coverage, *Vascular Cell* 6, 1-13

Yang Z., Wang X., Diao H., Zhang J. F., Li H., Sun H. a Guo Z. (2007) Encapsulation of Platinum Anticancer Drugs by Apoferritin, *Chemical Communications* 3453-3455

Yaromina A., Baumann M. a Krause M. (2012) Individualization of Cancer Treatment from Radiotherapy Perspective, *Molecular Oncology* 6, 211-221

Zhu M., Nie G., Meng H., Xia T., Nel A. a Zhao Y. (2013) Physicochemical Properties Determine Nanomaterial Cellular Uptake, Transport and Fate, *Accounts of Chemical Research* 46, 622-631

Zoete V., Cuendet M.A., Grosdidier A. a Michielin O. (2011) SwissParam, a Fast Force Field Generation Tool For Small Organic Molecules, *Journal of Computational Chemistry* 32, 2359-68

Zsila F. (2016) The anticancer Agent Ellipticine Binds to Glycosaminoglycans at Mildly Acidic pH Characteristic of the Extracellular Matrix of Tumor Tissues, *RSC Advances*, 810-814

Svoluji k zapůjčení této práce pro studijní účely a prosím, aby byla řádně vedena evidence vypůjčovatelů.

Jméno a příjmení s adresou	Číslo OP	Datum vypůjčení	Poznámka